



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EXPRESIÓN DE LOS GENES ARG1 Y ANXA3
EN LINFOCITOS DE PACIENTES CON
NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:
CUENANTZIN SALINAS GUALITO

DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. JUDITH VILLA MORALES
ASESOR DE TESIS:
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE



MÉXICO, D.F., OCTUBRE DEL 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Doy gracias a Dios por su infinito amor y por permitirme concluir con este trabajo, por poner en mi camino gente de bien y ejemplar que me ha enseñado lo bello que es la vida. A la Sta. Virgen del Carmen, por su intersección ante todas mis peticiones, ¡¡Gracias!!

A mis padres,

Por su amor, apoyo y dedicación porque con su amor incondicional y constancia han hecho de mí una buena mujer, porque este primer logro es tanto de ustedes como mío, ¡los amo! Y les estaré eternamente agradecida por todo lo que me han dado.

A mi hermano David Uziel,

Por ser incondicional en los momentos difíciles, porque a pesar de los roces y dificultades hay más que la misma sangre; tu eres y serás mi ángel por siempre y yo el tuyo. Sé que serás un hombre de bien ¡échale ganas!.

A mis abuelos y tíos,

Porque siempre han estado para mí, son mis segundos padres, gracias por su dedicación y cariño y por todo el apoyo a lo largo de estos años. Gracias a mi tío Victor Gualito porque siempre hizo hasta lo imposible por conseguirme desde grillos hasta camaleones disfrazados de lagartijas.

Al regalo más grande de mi vida,

Mi compañero, mi amigo, mi confidente y mi inspiración José Esteban Espinosa, porque has sido durante todo este camino un hombre de luz para mí, gracias por tu apoyo y tu confianza. A la Familia Espinosa Luna le agradezco que me hayan abierto las puertas de su hogar y de su corazón.

A mis hermanas,

Samantha Díaz y Tere López aunque por nuestras venas no corre la misma sangre, somos hermanas de corazón, gracias porque siempre han estado para mí, me han apoyado y animado en todo momento, ¡Dios las bendiga chicas, las quiero!

A los angelitos Ximena y Diego, porque en el último momento me dieron tranquilidad, y suerte sin que ellos lo sepan.

A mis amigos y confidentes,

Marian Solís y Adrian Tenorio, por su apoyo y su cariño porque nadie mejor que ustedes para entenderme, animarme y echarme porras de las buenas, porque aunque es poco el tiempo de conocernos para mí es como toda la vida, los quiero y espero que esta amistad con los años se fortalezca y perdure.

Con cariño

Cuenantzin Salinas Gualito

Agradecimientos Especiales:

A la M. en C. Judith Villa Morales por la excelente dirección de este proyecto, por su apoyo, paciencia y dedicación.

Al Dr. Diego Arenas Aranda, por recibirme en la UIMGH y su apoyo al proyecto.

A Dra. Eunice López por su importante asesoramiento y aportaciones.

Al Dr. Rubén Marroquin, la Q.F.B Ma. Lourdes Vega y el Q.F.B. Javier Parada por la revisión de este trabajo.

A la Máxima casa de estudios, por abrirme sus puertas y recibirme con los brazos abiertos, por darme las herramientas para ser una persona y un profesional honorable.

A la Dra. Raquel Retana Ugalde por el asesoramiento de este trabajo.

A la Bióloga Pilar Amellali por su paciencia y sus consejos, gracias por todas las buenas enseñanzas que me transmitiste.

A los compañeros y amigos de la UIMGH, por sus consejos, clases y compañía; Gaby, Xchel, Lashi, Rodri, Aglaé, la Técnico Lupita y la Q.F.B. Angélica Sandoval.

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica de Genética Humana, de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, con número R-2008-3603-29, bajo la dirección de la M. en C. Judith Villa Morales y la asesoría de la Dra. Raquel Retana Ugalde.

INDICE

LISTADO DE FIGURAS.....	II
LISTADO DE TABLAS.....	III
LISTADO DE GRÁFICAS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	5
SÍNDROMES NEURO CUTÁNEOS.....	5
<i>Neurofibromatosis</i>	5
NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1.....	5
<i>Criterios Clínicos</i>	7
<i>Características del gen NF1</i>	11
<i>Neurofibromina y actividad GAP</i>	12
<i>Vía de Señalización</i>	13
<i>Mutaciones en el gen NF1</i>	14
<i>Malignización de Neurofibromas</i>	17
ANTECEDENTES.....	18
ARGINASA 1	22
ANEXINA A3.....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
JUSTIFICACIÓN.....	27
OBJETIVOS.....	27
HIPÓTESIS	27
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	28
TIPO DE ESTUDIO.....	28
MUESTREO.....	28
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	28
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	28
VARIABLES DE ESTUDIO	28
METODOLOGÍA	30
OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS.....	30
OBTENCIÓN DEL RNA TOTAL	30
CUANTIFICACIÓN DE RNA	31

DIGESTIÓN DE DNA GENÓMICO	31
TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....	32
ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES DE PCR	32
DIAGRAMA DE FLUJO.....	34
RESULTADOS.....	35
PACIENTES SELECCIONADOS.....	35
OBTENCIÓN RNA TOTAL	38
AMPLIFICACIÓN DEL GEN CONTROL.....	39
AMPLIFICACIÓN DEL GEN ARGINASA1	40
AMPLIFICACIÓN DEL GEN ANEXINA3	41
ESTUDIO DENSITOMÉTRICO.....	42
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA AMBOS GENES <i>ANXA3</i> Y <i>ARG1</i>	47
SECUENCIACIÓN DE MUESTRAS DEL GEN <i>ANXA3</i>	48
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	56
PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS	58

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO DE NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1.	7
FIGURA 2 CRITERIOS CLÍNICOS.	10
FIGURA 3. ESQUEMA DE LA INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS Y LOS GENES IMPLICADOS EN LA PATOGÉNESIS DE LA NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1.	14
FIGURA 4. ESQUEMA DEL MECANISMO DE MALIGNIZACIÓN DE UN NEUROFIBROMA.	17
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA PARTICIPACIÓN DE LA ARGINASA 1.	22
FIGURA 6. MODELO DE INSERCIÓN EN LA MEMBRANA Y SU DESEMPEÑO COMO CANAL.	25
FIGURA 7. ESQUEMA DE LA OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS.	30
FIGURA 8. ESQUEMA DE LA EXTRACCIÓN DE RNA POR TRIZOL.	31
FIGURA 9 IMAGEN DE UN GEL DE AGAROSA AL 1.5% DONDE SE OBSERVA LA INTEGRIDAD DEL RNA.	38
FIGURA 10. VERIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL GEN CONTROL <i>HPRT</i>	39
FIGURA 11. VERIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL GEN <i>ARG1</i>	40
FIGURA 12. VERIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL GEN <i>ANXA3</i>	41
FIGURA 13. DIAGRAMAS DE DISPERSIÓN QUE SE OBTUVIERON CON EL PROGRAMA SSPS.	47
FIGURA 14. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA MUESTRA 4.	48
FIGURA 15. HOMOLOGÍA DE LA SECUENCIA DE LA MUESTRA 4.	49
FIGURA 16. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA MUESTRA 6.	50
FIGURA 17. HOMOLOGÍA DE LA SECUENCIA DE LA MUESTRA 6.	50

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1. MUTACIONES EN LA LÍNEA GERMINAL IDENTIFICADAS EN EL GEN <i>NF1</i>	16
TABLA 2. VARIABLES DE ESTUDIO	29
TABLA 3. SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	32
TABLA 4. PROGRAMAS DE AMPLIFICACIÓN.....	33
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.....	36
TABLA 6. CUANTIFICACIÓN DEL RNA TOTAL	38

LISTADO DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. DISTRIBUCIÓN DEL PORCENTAJE DE PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO.	35
GRÁFICA 2. DISTRIBUCIÓN DE ACUERDO A LA EXPRESIVIDAD CLÍNICA.	37
GRÁFICA 3. CORRELACIÓN CUALITATIVA DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>ARG1</i> Y <i>ANXA3</i> POR RANGO DE EDAD.	42
GRÁFICA 4. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO PARA EL GEN <i>HPRT</i>	43
GRÁFICA 5. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO PARA EL GEN <i>ARG1</i>	43
GRÁFICA 6. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO PARA EL GEN <i>ANXA3</i>	44
GRÁFICA 7. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO COMPARATIVO DE LOS GENES <i>HPRT</i> , <i>ANXA3</i> Y <i>ARG1</i>	44
GRÁFICA 8. NORMALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>ARG1</i> Y <i>ANXA3</i>	45
GRÁFICA 9 ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LOS GENES <i>ANXA3</i> Y <i>ARG1</i> Y LA EXPRESIVIDAD CLÍNICA DE CADA MUESTRA.	46
GRÁFICA 10. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIVIDAD CLÍNICA Y LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>ANXA3</i> Y <i>ARG1</i>	46

Abreviaturas

aa	Aminoácido
<i>ANXA3</i>	Gen de Anexina A3
ANXA3	Proteína de Anexina 3
<i>ARG1</i>	Gen de Arginasa 1
ARG1	Proteína de Arginasa 1
BCA	Ácido Binciconinico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	DNA complementario
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GADPH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosina Difosfato
GEFs	Factores Intercambiadores de Nucleótidos de Guanina
GRD	Dominio de activación relacionadas a GTPasa
GTPasa	Enzima de activación relacionado a guanidil trifosfatasa
GTP	Guanosina Trifosfato
HGMD	Human Gene Mutation Database
HIF-1	Factor de hipoxia 1
<i>HPRT</i>	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
IP13	Fosfoinositol-3- cinasa
LOH	Perdida de la heterocigocidad

MAPK	Proteincinasas activadas por mitógenos.
MEK	MAPK / ERK quinasa
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MPNSTs	Tumores malignos de vaina de nervio periférico
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF1	Neurofibromatosis tipo 1
<i>NF1</i>	Gen de susceptibilidad para la Neurofibromatosis tipo 1
NF2	Neurofibromatosis tipo 2
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Retrotranscripción mediante reacción en cadena de la polimerasa
Trizol	Tiocianato de guanidina

Resumen

La Neurofibromatosis 1 es una enfermedad con variabilidad en la expresión clínica, estos pacientes tienen mayor riesgo a desarrollar tumores tanto benignos como malignos, hecho que ha clasificado a esta enfermedad como síndrome de predisposición a malignización de tumores. En reportes anteriores se han estudiado genes involucrados en las vías de señalización y algunos asociados a tumorigénesis en neurofibromas. En un estudio piloto realizado en este grupo de investigación se analizaron leucocitos de pacientes con NF1 mediante Microarreglos de expresión, en el cual se encontraron genes infra y sobre expresados, entre los cuales destacaron Arginasa 1 y Anexina A3, dada la importancia que actualmente se ha encontrado en estos genes como posibles biomarcadores de malignidad. El objetivo de esta investigación fue demostrar si existe o no expresión de *ARG1* y *ANXA3*, en 13 muestras de pacientes con NF1, mediante PCR y análisis densitométrico; para realizar una posible correlación entre la expresión de dichos genes y el fenotipo de los pacientes con NF1. Se extrajo RNA de sangre periférica total, del cual se obtuvo DNA complementario mediante transcriptasa reversa, este se utilizó para amplificar el gen constitutivo *HPRT*, y los genes problema *ARG1* y *ANXA3*. Los resultados que se obtuvieron fueron: *ARG1* esta infra expresada en los pacientes con expresividad clínica leve y moderada (77%). El 23 % restante que tienen expresividad clínica severa, tienen sobre expresada *ARG1*, en dos de las 4 muestras. Para *ANXA3*, se encontró infra expresada en todas las muestras con expresividad leve, en dos de 3 moderados y en dos de los 4 severos. Una de las muestras moderadas presentó sobre expresada *ANXA3*. La correlación clínica entre la expresión de *ANXA3* y *ARG1* se observó con el número de manchas café con leche, mediante una correlación directa de Pearson.

Introducción

La Neurofibromatosis es una enfermedad del grupo de Síndromes Neurocutáneos, los cuales son un grupo de trastornos genéticos que producen diversas anomalías en el desarrollo cutáneo. La Neurofibromatosis tipo 1 es un desorden autosómico dominante y multisistémico, causado por diversas mutaciones en el gen *NF1* que está en el cromosoma 17, tiene una expresividad clínica variable. Esta patología ha sido estudiada mediante diferentes técnicas que han permitido profundizar en el conocimiento del gen *NF1*, dicho gen codifica para la neurofibromina, la cual es una importante proteína que participa en la vía de señalización de Ras además de que interviene con genes reguladores del ciclo celular. En un estudio piloto de microarreglos de expresión en pacientes con NF1, realizado en la UIM de Genética Humana de CMNSXXI del IMSS, en cada microarreglo fueron examinadas 43000 secuencias génicas, en los cuales se encontraron genes sobre e infra expresados de forma diferencial, fueron seleccionados algunos sobre expresados de acuerdo a las funciones de cada uno de ellos (*CAMP*, *MMP1*, *CEACAM8*, *ANXA3* y *ARG1*).

De acuerdo a la función de estos cinco genes, resaltó la participación de *ARG1* y *ANXA3* en procesos de cáncer y su participación en la tumorigénesis, como se ha demostrado en reportes recientes de *Surinder K. Batra* (2011).

La arginasa 1 es una enzima citosólica codificada por el gen *ARG1*, la cual está involucrado en diferentes procesos metabólicos como el ciclo de la urea y en la biosíntesis de la ornitina, es importante debido a su función como precursor de la poliamina, que es un promotor del crecimiento celular, la expresión de este gen se ha encontrado en desórdenes vasculares, pulmonares y en diversos tipos de cáncer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/383>).

El gen *ANXA3* forma parte de la familia de las anexinas, que son proteínas solubles que se unen a la membrana de fosfolípidos dependiente de calcio, *ANXA3* está involucrado en la señalización transduccional, la proteína se involucra en la regulación inmune y en el

transporte debido a su función como canal iónico. Los cambios de expresión de este gen se han visto asociados a diferentes procesos tumorigénicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/306>).

Existen reportes sobre la función de *NF1*, en los niveles de la expresión de diferentes genes, como *ANXA3* y *ARG1* los cuales son relevantes debido a que se han encontrado involucrados en procesos cancerígenos (*Villa M. 2009*).

En este proyecto se determinó si hay expresión de los genes *ANXA3* y *ARG1* mediante PCR, considerando una posible correlación en la expresividad clínica variable de cada paciente, así como identificar si estos genes pueden ser empleados como biomarcadores en pacientes con riesgo de malignización de los neurofibromas en un futuro.

Marco Teórico

Síndromes Neurocutáneos

También conocidos como Facomatosis; este término fue inicialmente propuesto por Van der Hoeve en 1923, la palabra se encuentra formada por dos términos griegos: *phakos* (mancha) y *oma* (tumor). Son trastornos frecuentemente hereditarios que cursan con desórdenes multisistémicos, con un grado variable de afección familiar y se caracterizan por alteraciones que aparecen en los sistemas nervioso y cutáneo (*Fernández M. 2007*). En ocasiones esta afección se encuentra en múltiples localizaciones (ósea, vascular, gastrointestinal, entre otras). En las fases iniciales del desarrollo embrionario aparecen lesiones displásicas que en el futuro pueden ser causa de procesos tumorales, algunos de los cuales podrán derivar en procesos malignos.

Neurofibromatosis

La Neurofibromatosis (NF) es un grupo de trastornos relacionados, pero genéticamente diferentes del sistema nervioso, se ha clasificado como Neurofibromatosis tipo 1 (NF1), Neurofibromatosis tipo 2 (NF2) y Schwannomatosis, la cual alguna vez fue considerada como una variación de la NF2. La neurofibromatosis pertenece al grupo de síndromes neurocutáneos que afectan principalmente los tejidos derivados de la cresta neural (*Guardia M. 2007*), considerado como el trastorno con mayor incidencia 1:3000 personas (*McPhee 1995*).

Neurofibromatosis tipo 1

La Neurofibromatosis tipo 1 (NF1), también conocida como enfermedad de Von Recklinhausen, es un desorden autosómico dominante y multisistémico que afecta aproximadamente a 1 de cada 3000 personas. La primera evidencia que se tiene registrada acerca de este trastorno se encuentra en el trabajo de Friedrich Daniel von

Recklinghausen, *On the Multiple Fibromas of the Skin and Their Relationship to the Multiple Neuromas* en 1882, en donde describe esta enfermedad en varios miembros de la misma familia determinando las diferentes manifestaciones clínicas. Se ha logrado comprender la patofisiología de la NF1 desde que fue descubierto el gen *NF1* en 1990.

Los criterios de diagnóstico clínico se establecieron en 1987, son siete los criterios mayores, de los cuales la presencia de dos o más de ellos determinan el diagnóstico de esta enfermedad (Figura 1).

1. Un mínimo de 6 manchas «*café con leche*» de diámetro superior a 5 mm en pacientes menores de 12 años, superior a 15 mm después de la pubertad.
2. Por lo menos dos neurofibromas dérmicos o un neurofibroma plexiforme
3. Manchas de salvado, pecas (*freckling*) axilares e inguinales
4. Glioma del nervio óptico o del quiasma óptico
5. Por lo menos dos hamartomas del iris (nódulos de Lisch) observables mediante lámpara de hendidura
6. Lesiones óseas sugestivas (displasia de esfenoides, adelgazamiento de la cortical de un hueso largo, pseudoartrosis)
7. Familiar de primer grado (padre, hijo o hermano) portador de una neurofibromatosis de este tipo. (*Taboada L. 2003*)

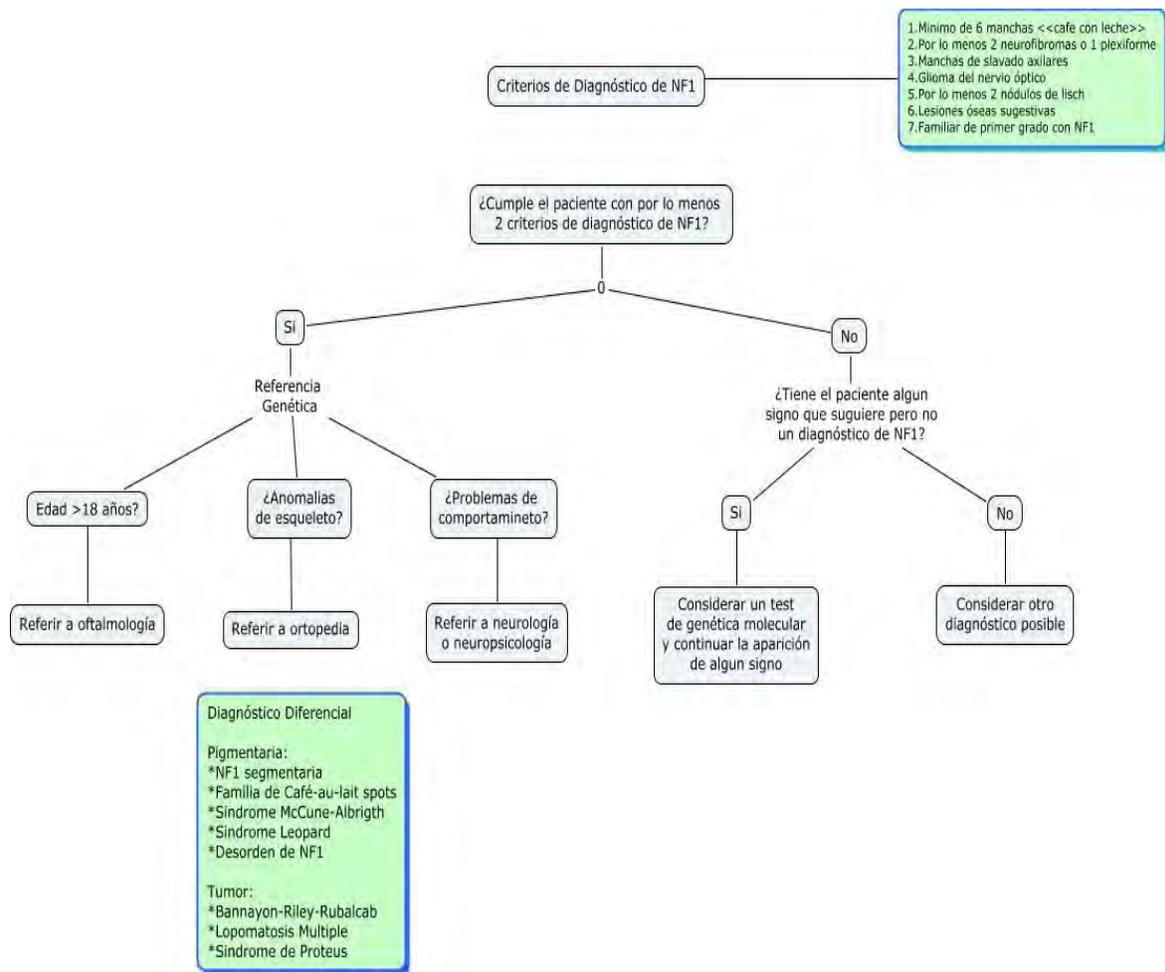


Figura 1. Algoritmo de Diagnóstico de Neurofibromatosis tipo 1. Método para el diagnóstico de un paciente que tiene algunas características de la NF1, pero no cumple plenamente los criterios de diagnóstico. [Modificado de Kevin P Boyde [et.al.] 2009; 6(1)]

Criterios Clínicos

Las máculas pigmentadas llamadas *café-au-lait (CALM)*, son lesiones que se encuentran bien delimitadas, con bordes y apariencia homogénea. Como su nombre lo indica el color se aproxima al café con leche pero pueden encontrarse también de un tono marrón oscuro. Están formadas principalmente de melanocitos hiperpigmentados que se originan en la cresta neural, en la epidermis, estas células pueden contener un gran número de los llamados melanocitos “gigantes” o macroglóbulos de melanina. Estas

máculas se presentan desde el nacimiento y se vuelven más numerosas con el crecimiento, suelen aparecer hasta la primera década de la vida, durante este período es común encontrar manchas mayores a 5mm de diámetro, en la edad adulta es habitual que el diámetro aumente y sea mayor a 1.5cm (Figura 2A) (Wolff, 2009; Listernick R. 1990).

Otro de los criterios críticos son los neurofibromas, los cuales se componen de una mezcla de células de Schwann, fibroblastos, células perineurales y célula cebada. Estos tumores benignos de las vainas de los nervios aparecen como masas separadas que se originan en los nervios periféricos. Entre los neurofibromas que se presentan comúnmente en la NF1 existen los cutáneos, subcutáneos y plexiformes.

Los neurofibromas cutáneos se localizan en la superficie cutánea y protruyen, al tacto son más lisos que el tejido conectivo circulante. En cuanto los subcutáneos, que se localizan tanto debajo de la piel como en las profundidades de los vísceras, por lo general son más duros y pueden afectar las raíces dorsales e invadir nervios mayores. La forma plexiforme se considera patognomónica y son tumores benignos de las vainas de los nervios periféricos que son capaces de afectar los fascículos nerviosos únicos o múltiples casi siempre se originan en los ramos de los nervios principales (Figura 2B) (Yuan Zhu, 2002 ; Fernández V. 2002).

Otro de los criterios patognomónicos son las pecas intertriginosas, las cuales, son pequeñas manchas café con leche, generalmente tienen un diámetro menor a los 2mm, estas efélides axilares se observan en el nacimiento, en el 30-40% de los casos y en otras áreas como la ingle, el periné y el cuello o el pliegue submamario. Estas pecas no están relacionadas con las que aparecen por exposición al sol, se conoce también como el Signo de Crowe, en honor al doctor Frank W. Crowe, quien lo observó solo en los pacientes de NF1 (Figura 2C) (Fernández V. 2002).

Los problemas oftalmológicos que se presentan en la NF1, son los nódulos de Lisch, son máculas pequeñas hiperpigmentadas en forma de cúpula que se encuentran en el iris, las cuales causan un deterioro de la visión. Es frecuente en niños mayores 6 años y se hacen evidentes mediante un examen con lámpara de hendidura, porque de esta manera se pueden distinguir de los nervios planos del iris. Otro signo que se puede observar en los pacientes de NF1 es el glioma óptico, son lesiones benignas poco comunes que se encuentran en el nervio óptico, los cuales están clasificados como astrocitomas pilocíticos. La incidencia de este tipo de lesión en pacientes con NF1 es del 39% aproximadamente (Figura 2D-E) (Singh 2009).

Es frecuente encontrar dentro de los signos clínicos alteraciones óseas, que aparecen en un tercio de los pacientes con NF1. Su intensidad es muy variable y oscila desde discretas lesiones subperiósticas (por expresión de los neurofibromas) hasta importantes deformidades. Se ha descrito lordosis, cifoescoliosis cervicotorácica, hipertrofia segmentaria, tórax en carina o pecho de pollo, macrocefalia con perímetro craneal superior al percentil 98 para su edad, hipertelorismo, pie equino, orejas de baja implantación, pseudoartrosis, afección de tibia y radio, afección pélvica, formación de quistes óseos con el consecuente riesgo de fracturas patológicas, fragilidad anómala y engrosamientos y alargamientos anormales (Singh 2009).

También a la NF1 se le han asociado algunos desórdenes cognitivos, las cifras indican que del 30 al 65% de pacientes pueden presentar hipotonía, alteraciones en la coordinación, déficit de atención (INP, 2009), en mecanismos de aprendizaje y defectos en la memoria a corto plazo, este último estudio se comprueba mediante resonancia magnética funcional, donde se puede observar una disminución de la actividad neuronal a nivel cortico-estriatal la cual esta relaciona con el deterioro de la memoria de trabajo (Shilyanskya 2010).

A



B



C



D



E

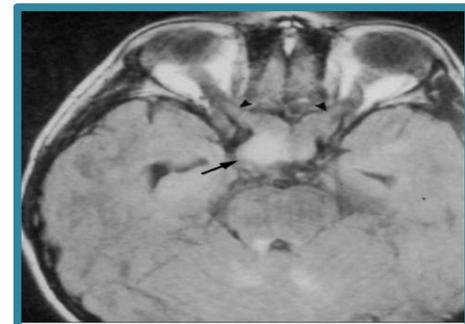


Figura 2 Criterios Clínicos. A. Manchas café-au-lait (CALM) [Vaillant Suárez [et.al.] 2010;14(5):719] B. Neurofibromas en cara y cuello [Aettone-Leon, 2006; 16(1):77;81] y B.(der.) Neurofibromas cutaneos [Falconí Rosadio 21(2), 2004] C. Neurofibroma plexiforme [Fernández Vozmediano JM [et.al.], 2002; 17(6):259-269] C. (der.) Signo de Crowe o pecas axilares D. Nódulos de Lisch. E. Glioma óptico bilateral con ensanchamiento de ambos nervios ópticos. [Pascual-Castroviejo [et.al.] 2008; 46 (9): 530-536]

Características del gen NF1

El gen *NF1*, se encontró en el cromosoma 17 específicamente en el brazo largo, región 11.2 se extiende por más de 350 kb, cuenta con tres isoformas que son capaces de producir un RNAm de 11 a 13 kb y contiene 60 exones. Se han identificado formas alternativas de splicing en la región del dominio GRD II, en el exón 23, en la región 3'ALT del exón 48 y el más recientemente descubierto en el extremo 5'ALT2 del exón 9 (*Hong Shen, 1996*).

El gen *NF1* codifica una proteína llamada Neurofibromina de un peso aproximado de 220-320 kDa, consta de 2818 amino ácidos. El gen *NF1* codifica una región de 360 aminoácidos, con una homología del dominio catalítico de la proteína activadora de GTPasa (GAP), esta región central del gen *NF1* abarca del exón 21 al 27. El dominio tiene la capacidad de acelerar la conversión de p21Ras-GTP que es su forma activa a p21Ras-GDP que es su forma inactiva, lo que indica que regula la actividad de Ras, es un regulador negativo de proliferación y diferenciación celular (*Yunoue 2008*). La Neurofibromina se ha podido encontrar en oligodendrocitos, células de Schwann no mielinizadas y células de Schwann malignizadas, recientemente fue posible confirmar su presencia en todas las partes del cerebro especialmente en la neuronas y en las células de Purkinje, aunque también se ha visto en queratinocitos y melanocitos.

Se ha observado que la neurofibromina contiene diversos lugares de fosforilación y se ha demostrado que esta constitutivamente fosforilada en residuos de serina y treonina, como respuesta a factores de crecimiento, aunque no se tiene claro el significado biológico de estas fosforilaciones. Se han descrito diferentes lugares que son fosforilado *in vitro* por la proteína cinasa dependiente de AMPcíclico (AMPc) y por una proteincinasa activada por mitógenos (MAPK). Se ha caracterizado una región de 80 residuos en el extremo amino-terminal, que se superpone con el dominio GRD, el cual es esencial para la unión a la tubulina, proteína que interacciona con la neurofibromina inhibiendo su actividad GAP (*Bollag, 1993*).

La importancia de este gen *NF1*, radica en su función de supresor de tumores, por lo que posee una secuencia genómica que incluyen del exón 21 al 27 (Dominio GRD), necesaria para el funcionamiento normal de la célula, cuando esta secuencia se pierde o sufre una mutación existe una pérdida de la función de la proteína que puede generar diversas alteraciones en el proceso de regulación supresora (Ríos H. 2001).

En estudios de tumores malignos, enfermedades mieloides y en neurofibromas de pacientes con este padecimiento se ha encontrado con lo que se conoce como pérdida de heterocigocidad (LOH), este proceso ocurre cuando en un gen supresor de tumores se pierden ambos alelos y no se puede generar la proteína normal. Esto indica que los pacientes que padecen *NF1* tienen cuatro veces mayor riesgo de desarrollar una enfermedad maligna (Radhika P, 2000).

Neurofibromina y actividad GAP

Se ha encontrado que la proteína Neurofibromina tiene homología con varios miembros de la superfamilia GAP, esta familia regula la actividad hidrolítica de la GTPasa promoviendo la ruptura del enlace fosfodiéster de GTP a GDP, lo que lleva a la inactivación del dominio conservado, ejemplo de ello encontramos a la proteína p120GAP, la primera identificada de este tipo; que al igual que neurofibromina, son proteínas que aumentan la velocidad de activación de esta GTPasa, aunque en sus dominios conservados difieren notablemente, ambas son capaces de hidrolizar a GTP, por ello se ve implicado en la vía de señalización de Ras (Mitsuharu E. 2009).

La familia del gen *RAS* está formada por más de 30 genes, esta se subdivide por su secuencia y relaciones funcionales en Ras, Rho, Rab, Ran y Arf, los miembros de esta superfamilia son reguladores versátiles de las GTPasas. Las mutaciones más frecuentes del oncogen *Ras* en diferentes tipos de cáncer ha sido: *H-Ras* (85%), *N-Ras* (12%) y *K-Ras* (3%) que codifican una proteína de aproximadamente 21 kDa. La proteína p21ras participa

en la vía que es regulada por neurofibromina, y se caracteriza porque tiene afinidad al nucleótido de guanina que posee una actividad GAPasa intrínseca, la cual acelera la hidrólisis de GTP-Ras a GDP-Ras, por esto se dice que funciona como un interruptor molecular que controla de forma crítica del crecimiento y la proliferación celular.

Vía de Señalización

Las proteínas Ras son pequeñas GTPasas monoméricas que tienen un papel determinante en diversos procesos celulares, tales como la supervivencia, la proliferación o la diferenciación celular. En estos procesos celulares, las proteínas Ras actúan en forma de interruptor molecular, pasando de un estado activo (Ras-GTP) y un estado inactivo (Ras-GDP). Su actividad está regulada por otras proteínas como son los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), que actúan activando a Ras, y las GAPs, estimulan la actividad GTPasa intrínseca de Ras acelerando que Ras pase a su estado inactivo. Las proteínas Ras son activadas por diferentes receptores situados en la superficie celular, gracias a la unión entre receptor y Ras, ésta se activa, por una serie de proteínas adaptadoras y los GEFs, que pueden interaccionar con diferentes tipos de efectores que, a su vez, participan en diferentes vías de transducción de señales. Hasta el momento, las vías mejor caracterizadas son las vías de serina/treonina-cinasa, Raf/MEK/ERK, y la de fosfoinositol-3-cinasa (PI3K) que envía señal a AKT y da como resultado la inhibición de la apoptosis. La señal traducida por estas vías será la que influya en los distintos procesos celulares dependientes de Ras (*Díaz R. 2000*). Finalmente, los efectos desencadenados por Ras y otras GTPasas convergen en la regulación de la maquinaria de ciclo celular (Figura 3).

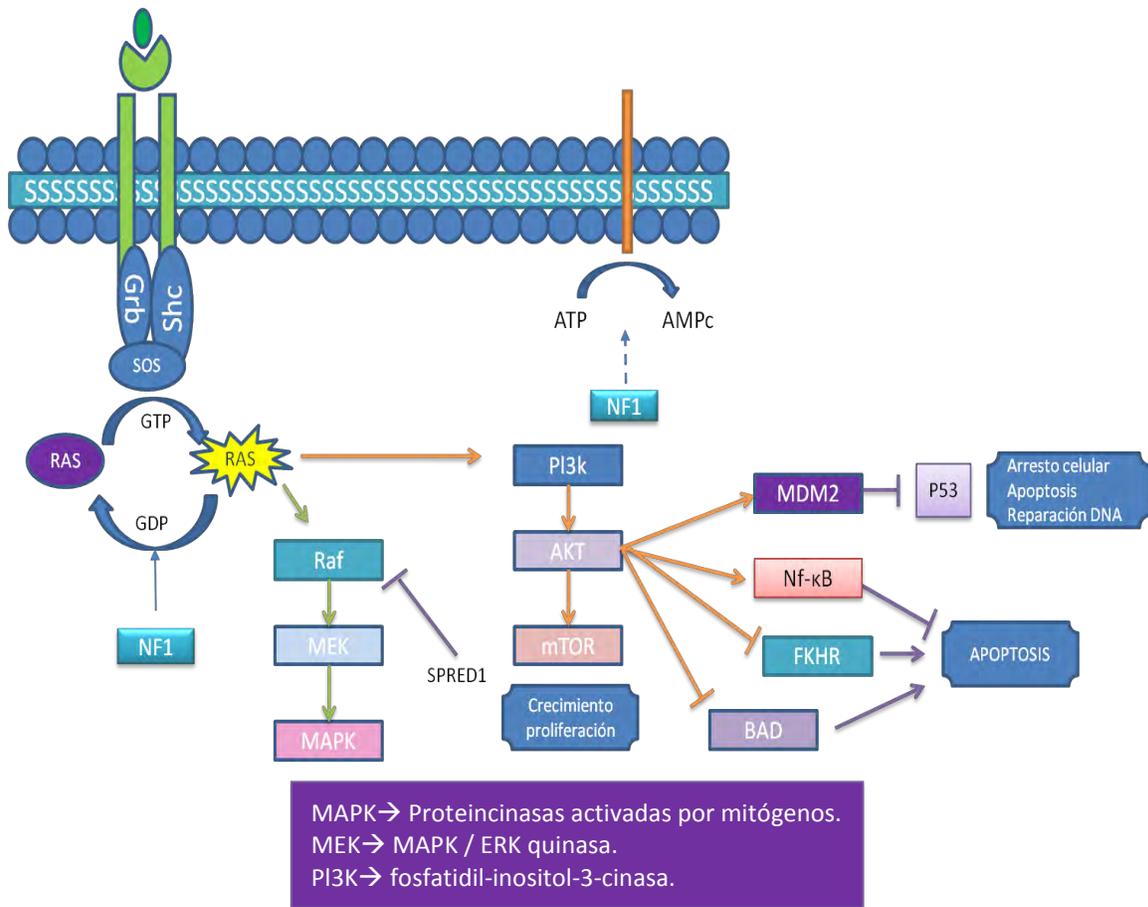


Figura 3. Esquema de la interacción de las proteínas y los genes implicados en la patogénesis de la Neurofibromatosis tipo 1. Debido a la homología del gen *NF1* con el dominio GAP, una proteína G, puede existir interacción en estas vías de señalización. La vía MAP/ERK es muy compleja ya que está involucrada en el crecimiento y la proliferación celular. SPRED1 es capaz de inhibir a Raf1; es un gen que se puede ver implicado en NF1. [Modificado de Kevin P Boyde [et.al.] 2009; 6(1) y Nature Reviews Cancer 2; 489-501 (2002)]

Mutaciones en el gen *NF1*

El análisis de mutaciones del gen *NF1* ha sido difícil debido a la extensión del gen, se han empleado diferentes técnicas y aunque ninguna de ellas puede identificar el 100% de las mutaciones se sabe que el 50% de los casos han sido esporádicos, 5% de los pacientes han perdido todo o gran parte del gen *NF1*, el 95% de los casos solo presenta una pequeña modificación del gen, lo que hace difícil la detección. Cualquiera de las modificaciones que se produzca en este gen implica la formación de una proteína anómala (*Bendova 2007*).

Existe un reporte del 2007, donde se realizó un estudio de un grupo de pacientes con NF1, en los cuales se identificaron diferentes deleciones, así como la supresión de múltiples exones o de un solo exón del gen *NF1*, en este estudio realizaron una correlación fenotipo-genotipo, en la que sugieren que la deleción del gen *NF1* en sus regiones flanqueantes, generalmente presentaban un fenotipo severo caracterizado por un mayor número de neurofibromas a corta edad, bajo coeficiente intelectual, deformación facial y una alta incidencia en la malignización en los tumores de la vaina nerviosa periférica (*De Luca 2007*).

Otras mutaciones que se han reportado son las puntuales, rearrreglos cromosómicos e inserciones. Según la Base de datos de Mutaciones de Genes Humanas (HGMD) han sido reportadas e identificadas más de 800 mutaciones del gen *NF1* (*De Luca 2007*). En la Tabla 1 se encuentran algunas de las mutaciones encontradas en el gen *NF1*.

Tabla 1. Mutaciones en la línea germinal identificadas en el gen *NF1*.

Mutación	Localización	Cambio en Neurofibromina
Aberraciones cromosómicas * t(1;17) (p34.3;qll.2) * t(1;17) (p34.3;qll.2)		¿? ¿?
Supresiones largas * del(731-835) * del(I 528-1845) * 517bpdel	Exón 6 Exón 10c-12a Intrón 32-37	Truncada Truncada Truncada
Supresiones largas * 11 kbdel * 90kbdel	Intrón 2-3 Final 3' Final 5'	Perdida de 28 aa ¿? ¿?
Hemicigosidad * >700kbdel	Intrón 27- exón 37 NF1 y loci adyacente	Truncada Sin Neurofibromina
Inserciones largas * 320bpins * 10kbins	Intrón 32 Indefinida	Truncada ¿?
Pequeñas deleciones * 2970delAAT * 4868delAC * 5123delCCACC * 5843delAA * 7260delT	Exón 17 Exón 28 Exón 28 Exón 31 Exón 41	Pierde Metionina Truncada Truncada Truncada Truncada
Pequeñas inserciones * 2027insC * 5466insT * 5852insTT * 7485insGG	Exón 13 Exón 29 Exón 31 Exón 41	Truncada Truncada Truncada Truncada
Duplicaciones * 5095dup(42bp) * 6922dup(10bp)	Exón 28 Exón 48	Truncada Truncada
Sustituciones en secuencias codificantes * C1318T * G3497A * A4256G * A4267G * T5795C	Exón 10a Exón 21 Exón 24 Exón 24 Exón 31	Truncada Gly1166Asp Lys1419Arg Lys1423Glut Lue1932Pro
Sustitución en Intrones y errores de splicing * A1721+3G(exon skipping) * A477686 (inserción en el transcripto 4pb) * A6364+4G (exon skipping)	Intrón 11 Intrón 31 Intrón 33	Truncada Truncada Truncada

¿? Se desconoce [Modificado de Ming Hong Shen, 1996; 33:2-17]

Malignización de Neurofibromas

El riesgo de malignización en NF1 se estima de un 4% a un 10% de los individuos afectados. Los neurofibromas plexiformes generalmente no se transforman a tumores de la vaina de nervios periféricos (MNSPTs). Estos tumores presentan mal pronóstico debido a su recurrencia y aparición de metástasis posterior a su resección (Rodríguez R. 2008). Debido a que el gen *NF1* es considerado supresor de tumores, la inactivación de ambas copias se pueden encontrar asociadas a tumores malignos y benignos. La transformación maligna de estos tumores en la neurofibromatosis tipo 1 no es bien conocida. Sin embargo, se ha descrito que para que se realice esta transformación deben estar asociados otros genes como el de supresión tumoral *p53* que se ha encontrado sobreexpresado en los tumores MPNST, lo que ha sugerido que su mutación desempeña un papel muy importante en la progresión de la malignización de tumores en neurofibromatosis (Halling 1996). Estudios subsiguientes han descrito la pérdida de la función del gen de supresión tumoral *p53* como causa en la patogénesis molecular de MNSPTs (Figura 4).

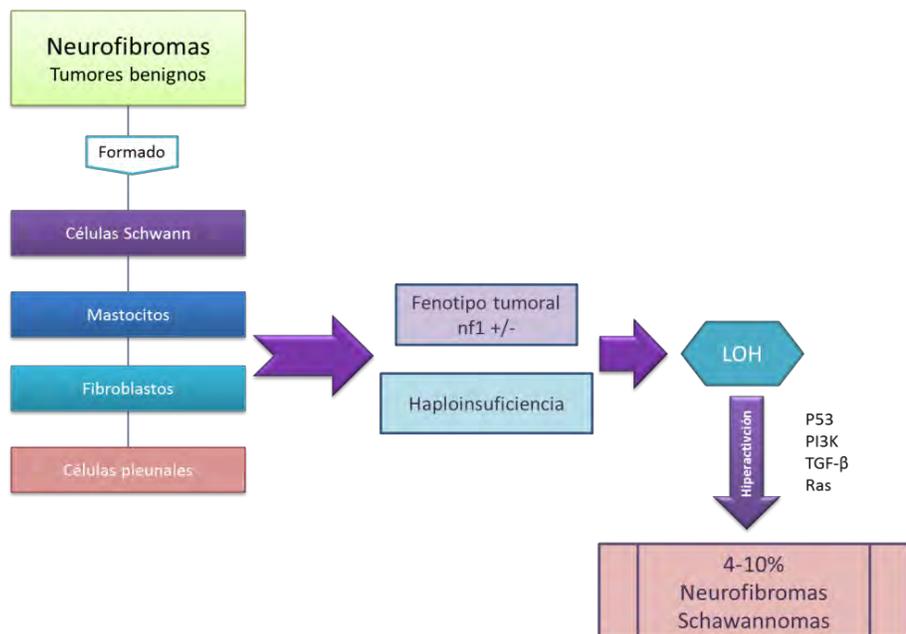


Figura 4. Esquema del mecanismo de malignización de un neurofibroma. Proceso por el cual un neurofibroma benigno puede sufrir malignización mediante pérdida de la función por pérdida de heterocigocidad (LOH), se observa mutación en otros genes y la hiperactivación de algunas otras vías de señalización. [Modificado D. Wade Clapp [et.al] 2006; 15(16): 2421–2437, Arjen Nikkels [et.al] 2006, 5:36 y D. Wade Clapp [et.al] 2006; 11(116):2880-2891]

Antecedentes

La Neurofibromatosis tipo 1 ha sido estudiada mediante técnicas de vanguardia, que pueden facilitar el estudio del gen *NF1*, como ya se mencionó el tamaño, el número de exones y el gran número de mutaciones que dicho gen ha presentado, hace que no sea fácil su estudio.

Diferentes grupos de investigación han realizado estudios moleculares de esta patología, han analizado la relación que existe entre los neurofibromas plexiformes y la formación de tumores malignos de vaina de nervios periféricos (MNSPTs). Estudios de *Ivan Bieché* realizados en Francia, investigaron la expresión de genes en tumores benignos (Neurofibromas), mediante RT-PCR en tiempo real; se investigó la expresión de 489 genes que participan en vías de señalización, los cuales están asociados a la tumorigénesis (formación de tumor) y aquellos genes que participan en la diferenciación de células de Schwann (*Levy P. 2004*).

Estudiaron 14 neurofibromas plexiformes, 9 MPNSTs y 10 neurofibromas dérmicos que son los más comunes en pacientes con Neurofibromatosis 1. Todas las muestras fueron procesadas en las mismas condiciones y con la misma cantidad, se midieron los niveles de expresión del RNAm mediante RT-PCR en tiempo real.

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: en total solo 27 genes se sobre-expresaron, de los cuales 16 genes se encontraron en todos los tumores MPNSTs y 14 genes se encontraron en los plexiformes, el 60 % de los genes sobre-expresados participan en funciones importantes como: proliferación celular (*MK167, TOP2A, CCNE2*), senescencia (*TERT, TERC/Htr*), apoptosis (*BIRC5/survivin, TP73*) y remodelamiento de matriz extracelular (*MMP13, MMP9*). También encontraron 13 genes sub-expresados en todos los MPNSTs, de estos genes 12 son específicos de tipos celulares como las células de Schwann (*L1CAM, MPZ, S100B, SOX10*) y mastocitos (*CMA1, TPSB*). Otros genes participan en el remodelamiento de matriz extracelular (*ITGBA4, TIMP4*) y en la vía de señalización

Hedgehog-Gli (*DHH, PTCH2*). Los resultados de este trabajo fueron importantes ya que encontraron dos genes que participan en la apoptosis, como *BIRC5/survivin* y *TP73* los cuales no habían sido reportados antes, los cuales están sobre-expresados en los tumores malignos, codifican una proteína antiapoptótica, la cual ya se sabe que está sobre expresada en cánceres humanos. Los resultados que obtuvieron sugieren que la activación inapropiada de vías de señalización ocurre específicamente en NF1 asociada a tumores malignos o en aquellos de tipo cerebral o de piel (*Levy P. 2004*).

Los microarreglos permiten estudiar miles de secuencias de genes diferentes, dicha prueba ayuda a reducir el tiempo en el análisis y tiene la posibilidad de ser validada por otras metodologías. Existe otro estudio realizado por *Douglas Fields (2004)* en el Instituto Nacional de salud en Bethesda, USA; en el cual se realizó un perfil transcripcional. En este trabajo se estudiaron líneas celulares (T265) derivadas de tumores malignos de vaina de nervio periférico (MPNSTs), provenientes de pacientes con Neurofibromatosis tipo 1, los cuales se compararon con otra línea derivada de células de Schwann normales. Se examinaron 4608 secuencias de cDNA mediante la metodología de microarreglos por duplicado. La obtención de los RNAm de ambas líneas celulares (tumoral y normal) se extrajo bajo las mismas condiciones. Las células de Schwann normales se extrajeron de dos donadores sanos.

El diseño experimental fue bajo las condiciones estrictas que exige el proveedor; los resultados obtenidos fueron los siguientes: 955 genes resultaron expresados anormalmente, en su mayoría los genes de la línea celular derivada del tumor maligno, de los cuales 100 genes están altamente expresados derivados de células de Schwann normal, se encontró que 88 genes no habían sido reportados que se expresaran en este tipo de células, dichos genes tienen funciones variables como: moléculas de adhesión celular, apoptosis, ciclo celular, receptores de factor de crecimiento, factores de crecimiento, neurotransmisores, traductores de señal y factores de transcripción (*Fields 2004*).

Grupos de investigación, están en la búsqueda de explicar el proceso de formación de tumores y/o el desarrollo de algún cáncer, esto ha permitido que se realicen numerosos estudios comparativos entre muestras de tejido normal y tejido enfermo, donde investigan cuales son los perfiles de expresión de cada grupo, y así es como se han determinado genes candidatos que funcionan como marcadores moleculares en el desarrollo de alguna enfermedad (*Hiatt 2004 ; Welsh 2001 ; Chao 2007 ; Leal 2007; Yang 2008*).

En nuestro laboratorio en el 2009, se realizó un estudio piloto de microarreglos de expresión en cuatro pacientes con NF1, se comparó la expresividad clínica variable contra los niveles de expresión génica, en este estudio si se encontraron diferencias en los niveles de expresión entre cada una de las muestras, se obtuvieron varios genes sobre e infra expresados de forma diferencial, los sobre expresados fueron *CAMP, MMP1, CEACAM8, ANXA3* y *ARG1*, entre otros; siendo estos últimos (*ANXA3* y *ARG1*) los genes de nuestro interés.

Recientemente, se ha observado que estos genes Anexina 3 y Arginasa 1 han sido estudiados por otros grupos de investigación como marcadores de pronóstico en diferentes tipos de cáncer, el trabajo de *Surinder K. Batra* en el 2011, en el cual se realizó un perfil transcripcional de células mononucleares de sangre periférica en pacientes con cáncer pancreático. Se emplearon células mononucleares de 26 pacientes con cáncer pancreático y 33 controles sanos se sometieron a microarreglos de cDNA y se encontró que 383 genes se expresaban de forma significativa entre los pacientes con cáncer pancreático y los controles sanos. El análisis identificó ocho posibles genes predictores, estos fueron: *SSBP2, Ube2b-rs1, CA5B, F5, TBC1D8, ANXA3, ARG1* y *ADAMTS20*, estos genes tiene potencial para ser usado en los algoritmos diagnósticos del cáncer pancreático. Este estudio es importante debido que muestra que es posible que dichos genes funcionen como marcadores de diagnóstico en sangre periférica (*Baine, 2011*).

Otros estudios como el realizado en el 2008 por *Brent Berwinen*, donde se investigó la participación de *ARG1* en cáncer de ovario en un modelo murino, se estudió la participación de los leucocitos vasculares, que son células que se encuentra en ovario tanto en humanos como en el modelo murino; estos leucocitos vasculares son capaces de expresar *ARG1* y de acumularse en masas. Es importante mencionar que estas células son capaces de suprimir marcadores como CD8+ y CD4+ de las células T, además de que esta inmunosupresión es dependiente de la expresión de *ARG1*, se bloqueó la actividad de *ARG1* en los leucocitos vasculares con *nor-NOHA* y se observó que se revocó la inmunosupresión, con lo cual es posible observar que arginasa 1 puede desempeñar diferentes papeles en el cáncer (*Bak, 2008*).

También se ha tratado de describir algunas de las funciones de *ANXA3* y su importancia como marcador pronóstico en algunos tipos de cáncer. Un trabajo importante es el de *Cristina Bianchi* en el cual se obtuvieron cultivos primarios de 60 cortes renales de pacientes con carcinoma renal. Se realizó un estudio de Western blot en donde se observaron las dos isoformas de la proteína con un peso de 33 y 36 kDa, además de que se diferenció en geles 2D cada uno de los spots. En este estudio se pudieron detectar las diferentes formas de splicing alternativo en el exón III, además de que mediante qPCR se analizó la presencia de cada una de las isoformas presentes en los cultivos de células de corteza renal, con lo que se fue posible determinar el patrón de expresión entre las células normales y las células tumorales renales (*Bianchi, 2010*).

Arginasa 1

El gen de la arginasa 1 (*ARG1*) está localizado en el cromosoma 6 en la región q23, la isoforma I es una enzima citosólica que se expresa predominantemente en el hígado como un componente de la urea. La arginasa 1 se encuentra involucrada en procesos metabólicos; como el ciclo de la urea y en la biosíntesis de ornitina (Morris, 2009). El proceso donde participa es en la hidrólisis de arginina a ornitina y urea, en este proceso se incrementa la expresión de arginasa1. La ornitina es el precursor de la poliamina el cual es promotor del crecimiento celular (Figura 5) (Wenjun, 2009).

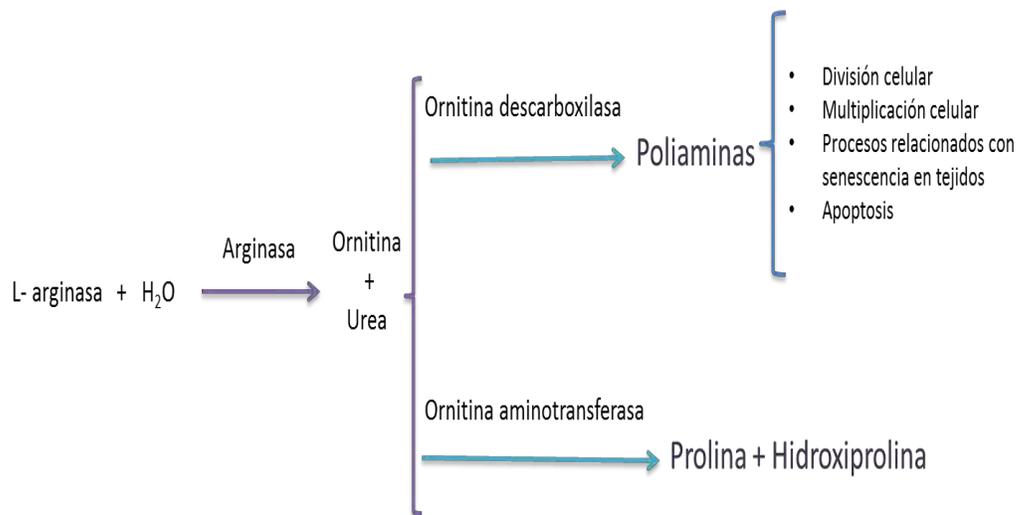


Figura 5. Esquema de la participación de la Arginasa 1 en la biosíntesis de Ornitina y Urea. La expresión de Arginasa 1 se incrementa durante estos procesos metabólicos. La hidrólisis de ornitina es importante porque promueve la síntesis de poliaminas, su presencia está asociada con los sistemas que regulan y controlan el crecimiento, la multiplicación y la diferenciación de las células, así como la apoptosis. [modificado de Ruiz Bedolla, 2009;56(1): 45-49]

En los mamíferos existen dos isoformas, arginasa 1 y arginasa2, que juegan un papel clave en la regulación de la mayoría de los aspectos metabólicos de la arginina (su hidrólisis). Trabajos recientes han centrado su atención en las funciones y regulación de la arginasa en enfermedades vasculares, enfermedad pulmonar, enfermedades infecciosas, en la función inmunología celular, puesto que se ha observado que es capaz de suprimir marcadores CD4 y CD8 de las células T induciendo así inmunosupresión, y en el cáncer

como el colorrectal, pancreático, prostático, ovárico, mamario, pulmonar (*Kitowska 2007*), hepático y gástrico (*Morris, 2009*). Recientemente se ha empleado como un marcador inmunohistoquímico para hepatocitos y en neoplasias hepatocelulares (*Park, 2005*). Es importante mencionar que también se han realizado estudios donde se mide la actividad de arginasa 1, como el estudio piloto de *Basu S.* del 2009, donde se midió esta actividad en suero y en tejido en 22 pacientes con carcinoma de las vías biliares y en 20 pacientes con colecistitis, se encontró una diferencia significativa en el incremento de la actividad de ARG1 en las muestras de carcinoma de las vías biliares, también se pudo observar diferencia entre la actividad de arginasa en los estados I (108.46 U/g de tejido), II (124.15 U/g de tejido) y III (142 U/g de tejido); siendo este último el que presentó la máxima actividad (*Shuka 2009*).

Existen reportes donde se ha estudiado su contribución en procesos cancerígenos, ejemplo de ello es el realizado por *Oliver Eickelberg* en el 2008, donde plantea la hipótesis que el metabolismo de la arginina se ve alterado en la fibrosis pulmonar afectando la síntesis de colágeno. Se realizó un análisis de expresión de enzimas claves en la vía de la arginina como: arginina metiltransferasa, transportadores de arginina y las arginasas mediante qRT-PCR y Western blot, estos análisis revelaron una expresión significativa de arginasas 1 y 2 y no de las demás enzimas durante el tratamiento con bleomicina en fibrosis pulmonar de ratón. Otro hecho importante es que se encontró el incremento de la expresión del mRNA y de las proteínas de arginasa 1 y arginasa 2 en los fibroblastos obtenidos de estos ratones con tratamiento de bleomicina en comparación con los obtenidos de ratones controles. La arginasa influye directamente en el metabolismo del colágeno, como ya se mencionó la arginasa produce ornitina que se metaboliza a poliaminas y L-prolina es altamente enriquecida en colágeno, lo cual es importante porque permite la adhesión de los fibroblastos (*Kitowska 2007*).

Anexina A3

El descubrimiento de la familia de las anexinas se llevó a cabo a principios de los 80's, estas son proteínas solubles capaces de unirse a las membranas de fosfolípidos en una forma dependiente de calcio, tienen en común una estructura altamente conservada de 70aa. El gen de Anexina A3 (*ANXA3*) se encuentra localizado en el cromosoma 4q21.21 (*Tait, 1991*), la proteína que codifica este gen recibe el nombre de anexina A3 se ha clasificado en el grupo de las calcimedinas, las cuales son proteínas mediadoras de señales de calcio también se ha incluido en el grupo de las lipocortinas las cuales son inhibidores de lipasa, que son inducibles por esteroides, dentro de este grupo se encuentran también Anexina A1, A2, A4, A5 y A6 (*Gerke, 2002*).

Al igual que las proteínas que se encuentran asociadas a la membrana, la ANXA3 está involucrada en procesos biológicos fundamentales en las células como la señalización transduccional, regulación inmune y transportación. Esto es posible debido a su acción como canal iónico dependiente de voltaje, aquellos que se activan mediante cambios de potencial de membrana, se encuentran también involucrados canales de sodio, potasio, calcio y cloro, los cuales se han encontrado relacionados en la biología del cáncer (Figura 6) (*Gerke, 2002 ; Kirilenko, 2001*). Además se ha visto involucrada también en la adhesión celular, mantenimiento del citoesqueleto, en la integridad de la matriz extracelular y en la coagulación de la sangre.

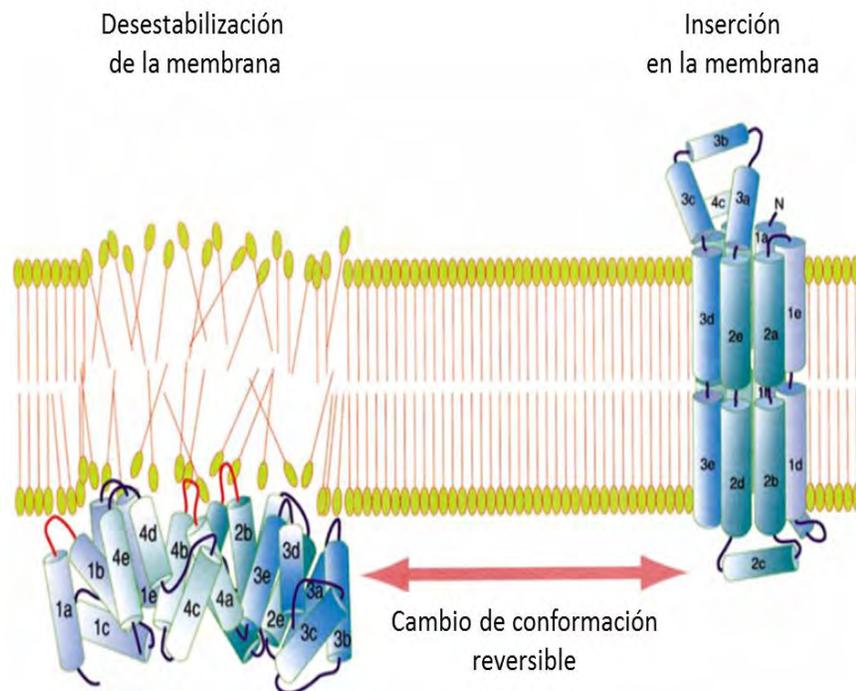


Figura 6. Modelo de inserción en la membrana y su desempeño como canal. Las Anexinas forman cambios conformacionales, de forma reversible, en respuesta a un incremento de la concentración de H^+ , de tal forma que exponen dominios altamente hidrofóbicos e inducen su inserción en la membrana. La presencia de un poro hidrofílico en la estructura posibilita su acción como canal iónico. [modificado de Volker Gerke. et.al. 2002]

La proteína anexina A3 tiene una homología estructural con otras anexinas, en particular con la anexina A5 debido a su dominio conservado de 70 aminoácidos, que corresponde a la estructura clásica de las anexinas, sin embargo, el extremo N-terminal de la A3 es más largo que el de A5 por 20 aminoácidos. El estudio del dominio III de la anexina A3 ha permitido conocer, como se puede ver afectada su actividad como canal iónico y su interacción con la membrana, lo cual es fundamental para que pueda desempeñar los procesos anteriormente mencionados (Sopkova, 2002).

De igual manera se ha observado en diversos estudios que la expresión de este gen está alterada en distintas neoplasias, según el tipo de tumor puede mostrarse un incremento en la expresión o la pérdida de ella, al igual que puede aumentar dicha expresión dependiendo del grado en que se encuentre el tumor (Chin Yeoh, 2010 ; De Luca, 2005).

En el 2008 se realizó un estudio de proteómica del adenocarcinoma de pulmón en donde se pudo identificar que anexina A3 puede servir como marcador en el progreso del estadio clínico, en el trabajo de Z.C Chense donde se analizaron células tumorales de tejido con metástasis de ganglios linfáticos y tejido de ganglio linfáticos sin metástasis, se examinaron células de estos tejidos debido a que el pronóstico de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón está estrechamente relacionada con esta metástasis y la metástasis a distancia. Se realizaron geles 2D-DIGE y se hizo análisis de espectrofotometría de masas en donde se obtuvieron 20 proteínas diferenciales, entre ellas ANXA3 la cual fue validada por Western blot e inmunohistoquímica, donde se encontró sobre expresada en el tejido metastásico de ganglios linfáticos, además de que se vio relacionada su elevada expresión con el avance del estadio clínico, el aumento de la tasa de recaída y la disminución de la supervivencia global (*Park, 2005*).

Estos cambios en la expresión de la anexina A3 se han visto vinculados con el proceso de tumorigénesis. Se ha encontrado sobrepresada en cáncer oral, cáncer colorrectal, carcinoma de hígado, cáncer en vías biliares, además del mencionado adenocarcinoma de pulmón. Se ha demostrado que induce a la vascularización y angiogénesis de tumores mediante la transactivación del HIF-1 (*Liu 2009*), además de que se ha sugerido que se encuentra involucrada en el proceso de fusión granular, las isoformas de esta proteína (33 y 36kDa) se encuentran en neutrófilos y monocitos y están asociadas con los gránulos citoplasmáticos de las células; se sabe que durante la opsonización las proteínas se translocan a la membrana del fagosoma además que se ha sugerido que la anexina A3 puede estar involucrada regulando otras funciones en neutrófilos y monocitos (*Cabec, 1994*).

Planteamiento del problema

Hasta el momento no se ha logrado una clara correlación fenotipo-genotipo debido a los diferentes tipos de mutación que se han encontrado en el gen *NF1* y a la expresividad clínica de la enfermedad; así como tampoco se han logrado identificar marcadores de valor pronóstico en pacientes con NF1.

Justificación

Es necesario identificar posibles biomarcadores que permitan determinar o establecer un valor pronóstico para identificar pacientes con riesgo de malignización de los neurofibromas, o algún otro signo clínico, nosotros partimos de un estudio inicial en el que se observó si existe o no expresión de Arginasa 1 y Anexina A3 en un grupo de pacientes con NF1 de diferente expresividad clínica en sangre periférica.

Objetivos

- Determinar la expresión de *ARG1* y *ANXA3* en pacientes con NF1, mediante RT-PCR y análisis densitométrico.
- Correlacionar el fenotipo de cada uno de los pacientes con respecto a la expresión o no expresión de los genes *ARG1* y *ANXA3*.

Hipótesis

La expresión de los genes *ARG1* y *ANXA3* están asociados con la expresividad clínica variable de los pacientes con Neurofibromatosis tipo 1.

Diseño de investigación

Tipo de Estudio

- Observacional
- Transversal
- Prospectivo
- Descriptivo

Muestreo

Las muestras sanguíneas se obtuvieron de pacientes con Neurofibromatosis Tipo I, que acudieron al servicio de Genética y Dermatología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Criterios de Inclusión

- Pacientes con diagnóstico clínico de Neurofibromatosis tipo 1.
- Que aceptaron participar bajo consentimiento informado por escrito.

Criterios de Eliminación

- Negativa a firmar el consentimiento informado.
- Muestras sanguíneas inadecuadas en el almacenamiento o que no se obtuvo el rendimiento necesario para ser procesadas.

Variables de Estudio

- Expresión de *ARG1* y *ANXA3*.
- Expresividad clínica. (Tabla 2)

Tabla 2. Variables de Estudio

Variable	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medición
Presencia de expresión de <i>ANXA3</i> y <i>ARG1</i>	Nivel de producción de <i>ANXA3</i> y <i>ARG1</i>	Sobre expresada Normo expresada Sub expresada	Semi-Cuantitativa (Píxeles)
Expresividad clínica	Expresión clínica de acuerdo a 12 características clínicas seleccionadas.	5 características cuantitativas 7 características cualitativas dicotómicas	*Número de manchas café con leches (pequeñas y grandes), número de neurofibromas cutáneos, número de neurofibromas subcutáneos, número de neurofibromas plexiformes. *Ausencia de: pecas axilares, máculas violáceas, nódulos de Lisch, dismorfias faciales, escoliosis, problemas de aprendizaje, neoplasias= 0 *Presencia de: pecas axilares, máculas violáceas, nódulos de Lisch, dismorfias faciales, escoliosis, problemas de aprendizaje, neoplasias= 1

Metodología

Obtención de leucocitos

Para la obtención de leucocitos, se procesó la sangre total periférica con una solución de lisis de eritrocitos, la cual fue empleada en una relación de volumen 1:5; se agregaron 2mL de sangre total y 10mL de solución de lisis y se mezcló por inmersión, se colocó en hielo por 20 minutos y posteriormente, se prosiguió a centrifugar a 2000 rpm por 4 minutos a temperatura ambiente. Una vez sedimentados los leucocitos, se realizaron dos lavados más con la misma solución de lisis con una relación de volumen 2:1 de acuerdo al volumen inicial de sangre periférica y se centrifugó en las mismas condiciones. El pellet obtenido corresponde al paquete leucocitario, se lavó por última vez con 30 μ L de PBS. (Figura 7).



Figura 7. Esquema de la obtención de leucocitos. A. Antes de la centrifugación. B. Posterior a la centrifugación y lavos con PBS.

Obtención del RNA total

Se extrajo el RNA total mediante la técnica de Trizol (Tiocianato de guanidina). Al paquete leucocitario, se le agregó un volumen de trizol, se mezcló perfectamente y posteriormente se le agregó el cloroformo. Se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se procedió a centrifugar por 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. Se obtuvieron las tres fases, se retiró el sobrenadante transparente, al cual se la adicionó

isopropanol frío en un volumen 1:1, se incubó a 4°C durante 1 hora y se centrifugó en las condiciones anteriores durante 15 minutos. Al pellet obtenido se le lavó con etanol al 70%. Una vez obtenido el pellet limpio se dejó evaporar el resto del etanol y se hidrató en 30µL de agua libre de RNAsas (DEPC). Se verificó la integridad de las muestras de RNA mediante una electroforesis en geles de agarosa al 2 % y se cuantificó por espectrofotometría. Se almacenó a menos 30°C (Figura 8).

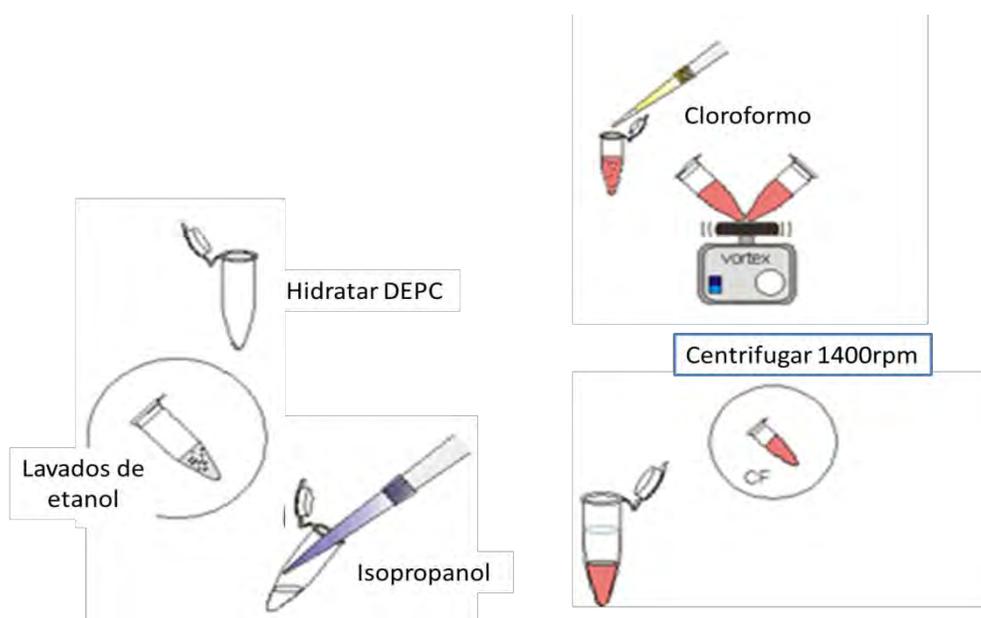


Figura 8. Esquema de la extracción de RNA por Trizol.

Cuantificación de RNA

Se empleó el equipo NanoDrop 1000 (*Thermo Fisher Scientific*). Se colocó una alícuota de RNA total de 1.0µL en la celdilla para el análisis espectrofotométrico.

Digestión de DNA genómico

Se empleó el Kit de DNasa I recombinante libre de RNasa de *Roche* para la eliminación del DNA genómico de las muestras de RNA total, se colocó RNA, buffer de incubación y la DNasa I se incubó durante 20 minutos a 37°C. Se inactivó la acción de la endonucleasa mediante 2µL de EDTA 0.2M incubando durante 10 minutos a 75°C. Se verificó la

integridad y la pureza del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa 1.5% y se cuantificó nuevamente.

Transcripción Reversa

Se empleó el kit comercial *Superscript First-Strand System* de *Invitrogen life Technologies*. Se partió de 200ng de RNA libre de DNA genómico, se adicionó el iniciador de la reacción dNTPs. La mezcla se incubó por 5 minutos a 65°C, posteriormente se colocó en hielo por 1 minuto y se le añadió el MIX, el cual incluye buffer, MgCl₂, DTT y la RNasa, se mezcló y se centrifugó y se colocó a 42°C durante 2 minutos, se le añadió 1 µL de Superscript II RT, se mezcló y se colocó a 42°C por 50 minutos, posteriormente 70°C durante 15 minutos. Finalmente se le añadió la RNasa H y se llevó a 37°C por 20 minutos.

Estandarización de condiciones de PCR

A partir del cDNA obtenido, se realizaron ensayos de gradiente de MgCl₂ así como de temperatura para determinar las condiciones adecuadas para cada uno de los transcritos, se utilizó como gen constitutivo *HPRT* (Hipoxantin-guanidin fosofribosiltransferasa) con la finalidad de no dar falsos negativo o positivos.

Una vez estandarizadas las condiciones, se procedió a la amplificación de los genes *Anexina3 (ANXA3)*, *Arginasa1 (ARG1)* y *HPRT*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para lo cual se diseñaron los oligonucleótidos sentido y anti sentido para cada secuencia en estudio (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos

	<i>HPRT</i>	<i>ARG1</i>	<i>ANXA3</i>
PRIMER IZQUIERDOR (F)	AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA	AAGGAAAGATTCCCGATGTG	CATGGCATCTATCTGGGTTG
PRIMER DERECHO (R)	AAGCAGATGGCCACAGAACT	CCGAAACAAGCCAAGTTAT	TCATCTCTTCTGCCATCTGC
TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)	267	457	498

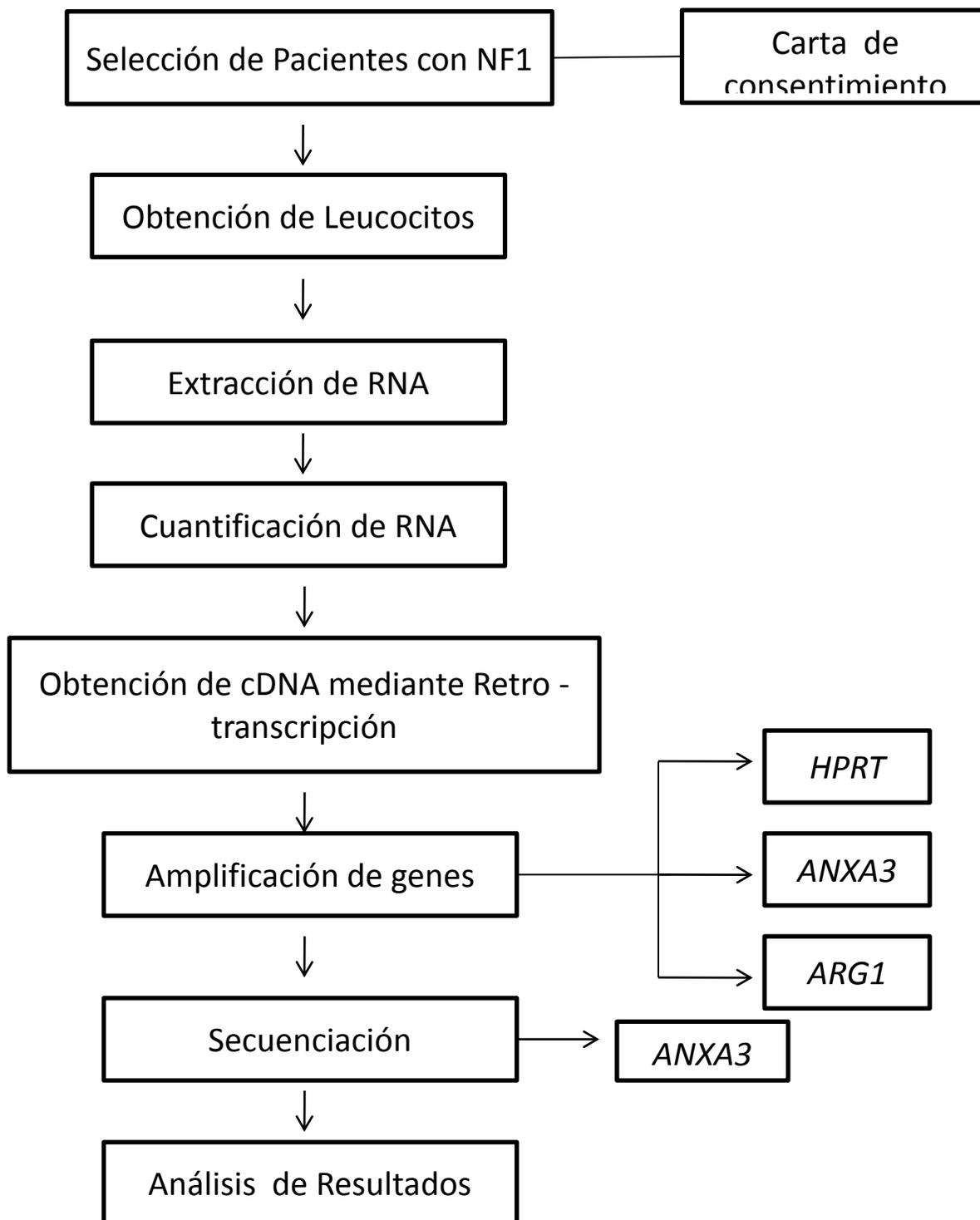
Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Corbett Research, con los siguientes programas de amplificación (Tabla 4).

Tabla 4. Programas de amplificación

	<i>HPRT</i>	<i>ARG1</i>	<i>ANXA3</i>
TEMPERATURA DE DESNATURALIZACIÓN	95°C por 3 minutos		
NÚMERO DE CICLOS	35	35	35
°T Y TIEMPO DE DESNATURALIZACIÓN	94° C	94° C	94° C
	20 segundos	30 segundos	30 segundos
°T Y TIEMPO DE ALINEACIÓN	58° C	59° C	58° C
	20 segundos	30 segundos	30 segundos
°T Y TIEMPO DE ELONGACIÓN	68°C	68°C	68°C
	20 segundos	30 segundos	30 segundos
EXTENSIÓN FINAL	68° C por 5 minutos		

Para la verificación de los productos de PCR se realizó un gel de agarosa de 1.5% con TBE al 1x. En cada pozo del gel se cargaron 3µl de cada amplificado de las muestras con 1µL de Silver gold y 1µL de buffer de carga. Se empleo un marcador de peso molecular de 100pb de Promega. Se corrió la electroforesis a 60V durante 2 horas.

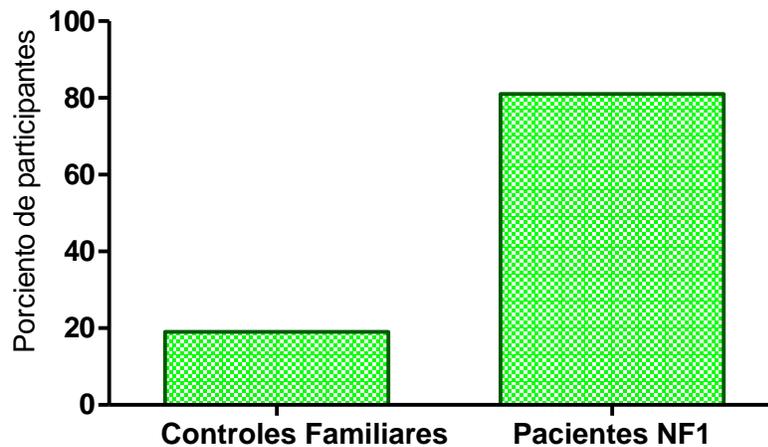
Diagrama de Flujo



Resultados

PACIENTES SELECCIONADOS

Seleccionamos muestras de pacientes con diagnóstico de Neurofibromatosis tipo 1 de julio a noviembre 2011 que acudieron al servicio de Genética y Dermatología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Del total de participantes en el estudio 3 (19%) fueron controles familiares y 13 (81%) fueron muestras de pacientes con NF1 con expresividad clínica variada (Gráfica 1)



Gráfica 1. Distribución del porcentaje de participantes en el estudio. Total de participantes del estudio 16 de los cuales: 3 controles familiares y 13 pacientes con diagnóstico Neurofibromatosis tipo 1.

Se realizó una revisión de cada uno de los pacientes para determinar el número y el tamaño de las manchas café con leche, los diferentes neurofibromas: cutáneos, subcutáneos y plexiformes, además de la existencia de dismorfismo facial, así como sus antecedentes familiares, con ayuda del departamento de ortopedia y oftalmología se determinó la presencia o ausencia nódulos de Lisch, glioma óptico y escoliosis. (Tabla 5)

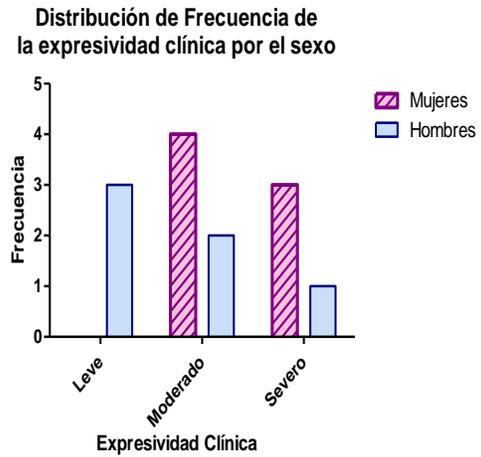
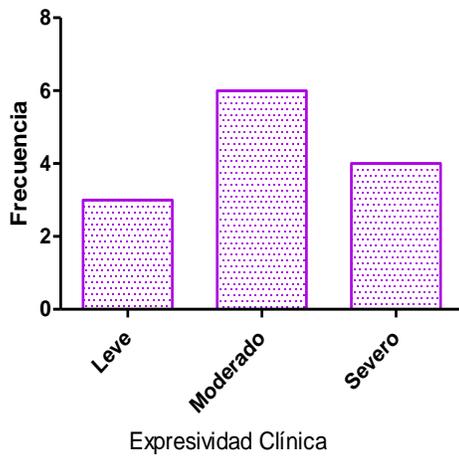
Tabla 5. Características Clínicas de los pacientes

Numero de paciente	Sexo	Expresividad clínica	Manchas café con leche de 0.5-1.5 total	Manchas café con leche >1.5 total	Total Manchas café con leche	Neurofibromas cutáneos	Neurofibromas subcutáneos	Neurofibromas plexiformes	Nódulos de Lisch	Dismorfismo facial	Escoliosis	Dificultad de aprendizaje	Neoplasia	Glioma del nervio óptico	Antecedente familiar
2	F	Moderado	32	13	45	22	43	1	Si	Si	No	Si	No	No	Si
4	M	Moderado	34	21	55	>200	12	1	No	Si	SD	Si	No	No	Si
5	M	Severo	15	25	40	>165	69	0	Si	Si	Si	Si	No	No	Si
6	F	Severo	>123	10	>133	134	53	0	Si	No	Si	Si	Si	No	Si
7	F	Severo	21	19	40	105	28	0	No	Si	SD	Si	Si	Si	Si
10	M	CONTROL FAMILIAR													
12	F	Severo	75	26	101	17	12	1	Si	No	No	No	No	No	No
14	M	Leve	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	M	Moderado	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
18	F	CONTROL FAMILIAR													
19	F	Moderado	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20	M	Leve	22	12	34	0	0	1	Si	Si	No	No	No	No	Si
21	M	Leve	55	15	70	0	14	1	Si	Si	No	No	No	No	No
22	F	Moderado	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23	F	Moderado	12	23	35	159	50	2	Si	Si	No	No	No	No	Si
24	F	CONTROL FAMILIAR													

- * M → masculino
- * F →femenino
- * NA→ No asistió a la cita
- * SD →Sin Diagnóstico

Los pacientes que no acudieron a la cita de revisión exhaustiva, los datos clínicos se determinaron mediante el expediente, por lo cual no se cuenta con el número de neurofibromas exacto, ni con el número de manchas café con leche, pero se considera que cubren los tres criterios clínicos para saber que si tienen la enfermedad de Neurofibromatosis tipo 1.

Los pacientes con diagnóstico de Neurofibromatosis tipo 1 se clasificaron de acuerdo al número de neurofibromas y manchas café con leche, en expresividad leve, moderada y severa. (Gráfica 2 A-B).



A

B

Gráfica 2. Distribución de acuerdo a la expresividad clínica. A. Se observa la distribución de frecuencias por expresividad clínica de los pacientes con NF1. Considerando el total de muestras en el estudio. B. Distribución de frecuencias según el sexo de cada participante. La expresividad clínica se definió de acuerdo al número de neurofibromas y CALMS presentes.

OBTENCIÓN RNA TOTAL

Se extrajo RNA total a partir de leucocitos de sangre periférica, mediante la técnica de Trizol, se verificó la integridad del RNA en un gel de agarosa al 2% (Figura 9) y se cuantificó en un equipo Nanodrop (Tabla 6).



Figura 9 Imagen de un gel de agarosa al 1.5% donde se observa la integridad del RNA.

Tabla 6. Cuantificación del RNA total

Muestra	ng/ μ L
R01	156.51
R02	106.00
R04	188.26
R05	127.88
R07	38.22
*R10	45.17
R12	368.30
R14	762.34

Muestra	ng/ μ L
R15	209.05
*R18	361.51
R19	244.07
R20	54.91
R21	125.94
R22	222.63
R23	84.54
*R24	100.79

* Muestras de controles familiares

AMPLIFICACIÓN DEL GEN CONTROL

Por medio de la técnica de RT-PCR, se amplificó el gen constitutivo *HPRT*, empleado como control. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se observó la expresión, en donde las muestras 20, 21, 22, 23 y 24 no muestran la misma intensidad que el resto de las muestras; a pesar de que las muestras fueron ajustadas a la misma concentración de cDNA, 250ng (Figura 10).

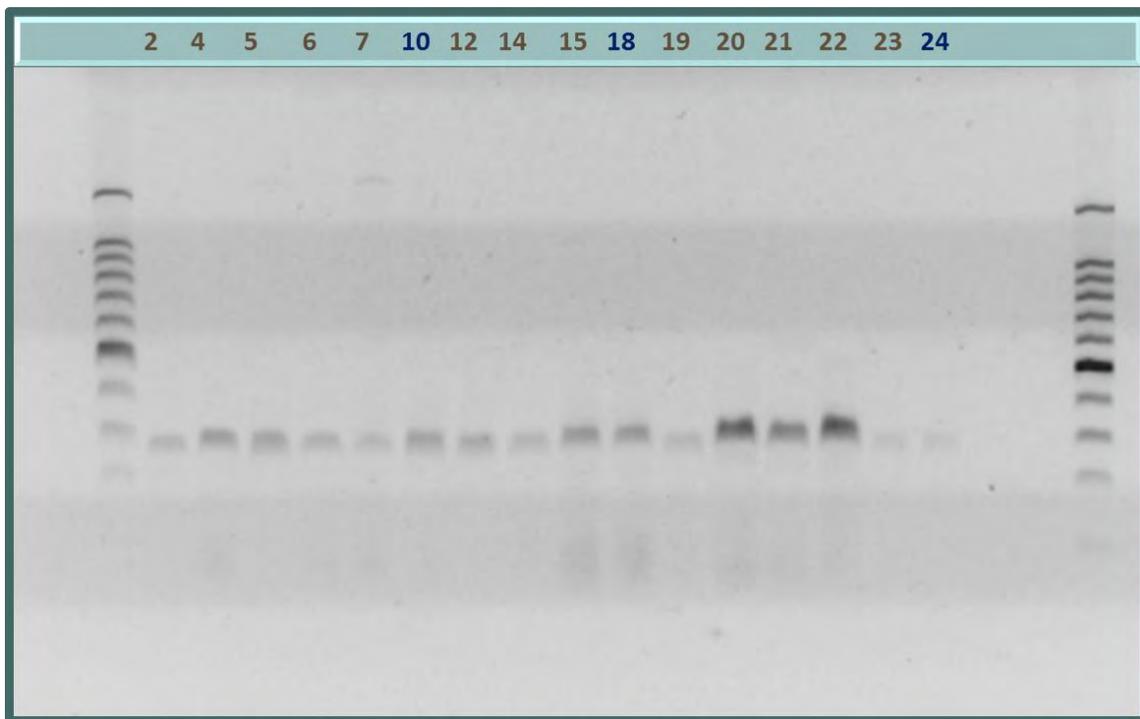


Figura 10. Verificación de los productos de PCR del gen control *HPRT*. El tamaño esperado de *HPRT* es de 267pb, el primer y el último carril es el marcador de peso molecular de 100pb. Las muestras 10, 18 y 24 son controles familiares. Se muestra la expresión del gen constitutivo en todas las muestras, sin embargo, la intensidad de los productos no fué homogénea aunque la concentración de cDNA fue ajustada en todas las muestras.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN ARGINASA1

Empleando RT-PCR se amplificó el gen *ARG1*. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% fue posible observar la expresión de dicho gen, en donde solo las muestras 6, 10, 12, 14 y 18 amplificaron con diferente intensidad; de ellas la muestra 6 y 12 son pacientes de expresividad severa, dos son controles familiares y la muestra 14 es paciente de expresividad leve en donde la intensidad de banda sugiere que se encuentra con mayor expresión (Figura 11).

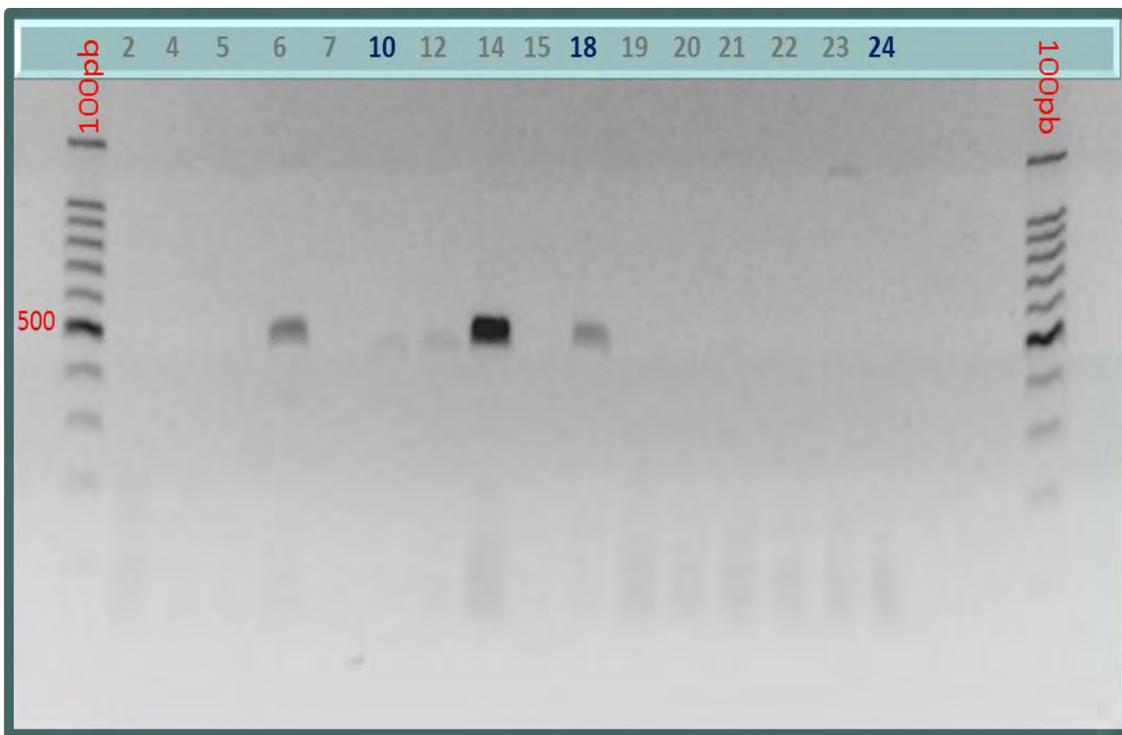


Figura 11. Verificación de los productos de PCR del gen *ARG1*. El tamaño esperado de *ARG1* es de 457pb, el primer y el último carril es el marcador de peso molecular de 100pb. Las muestras 10, 18 y 24 son controles familiares. Solo las muestras 6,10,12,14 y 18 mostraron la expresión del gen, sin embargo la intensidad de los productos no fue homogénea, en la muestra 14 de expresividad leve, es posible observar la banda de mayor intensidad.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN ANEXINA3

Utilizando la misma técnica, se amplificó el gen *ANXA3*, por medio de una electroforésis en gel de agarosa al 1.5% fue posible verificar la expresión de *ANXA3*. En donde se observa que está expresado en todas las muestras, sin embargo, se observaron dos productos con una diferencia aproximada de 50pb. La intensidad no fue la misma en las 16 muestras, las de mayor intensidad fueron 6, 14, 15 y 18; las de intensidad media son 4, 5, 10 y 12 las muestras restantes 2, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 muestran una leve intensidad de banda (Figura 12).

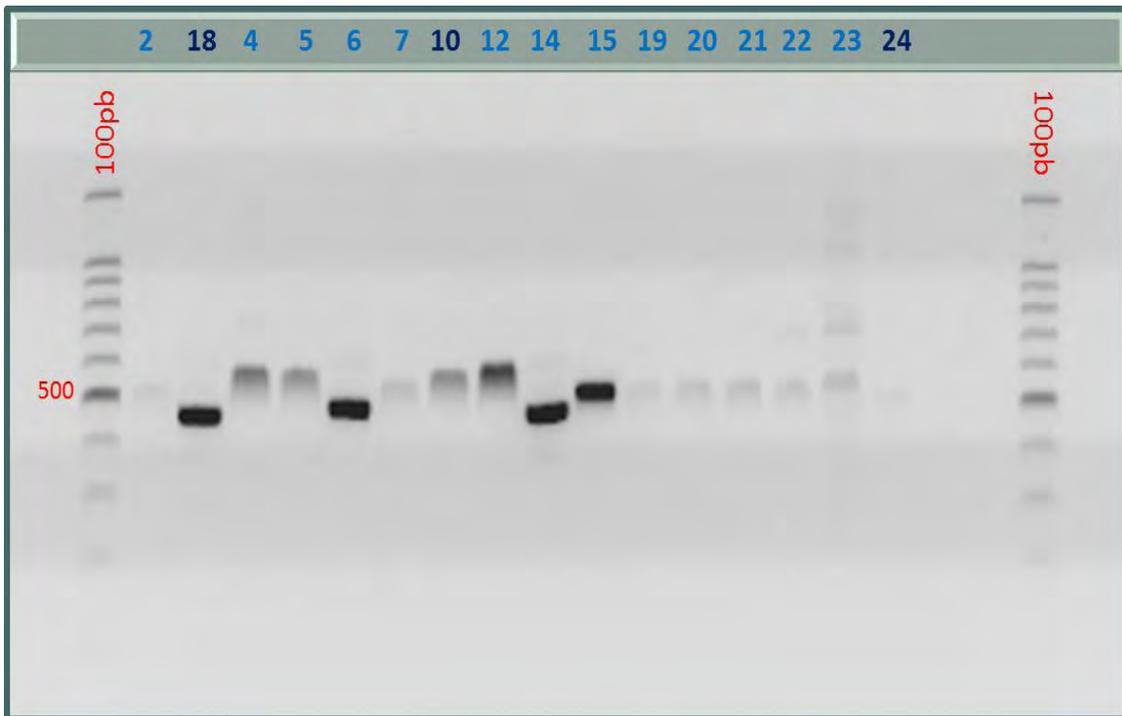
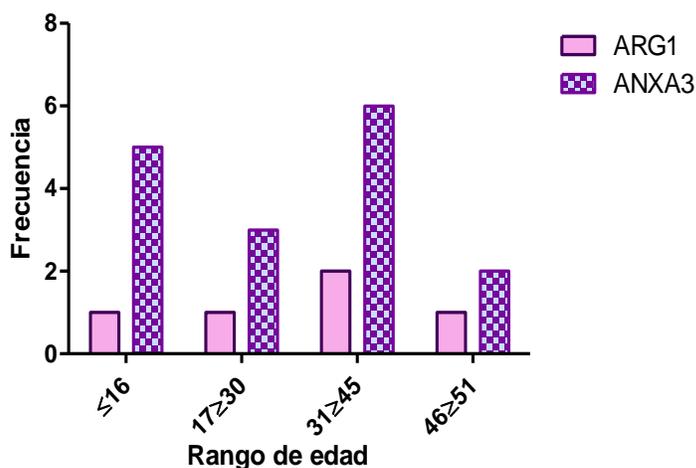


Figura 12. Verificación de los productos de PCR del gen *ANXA3*. El tamaño esperado de *ANXA3* es de 498pb, el primer y el último carril es el marcador de peso molecular de 100pb. Las muestras 10, 18 y 24 son controles familiares. Todas las muestras mostraron la expresión del gen, sin embargo la intensidad de los productos no fue homogénea, los carriles que muestran mayor intensidad son los marcados con 6, 14, 15 y 18. Los carriles que muestran diferencia en el peso del amplificado son 6, 14 y 18.

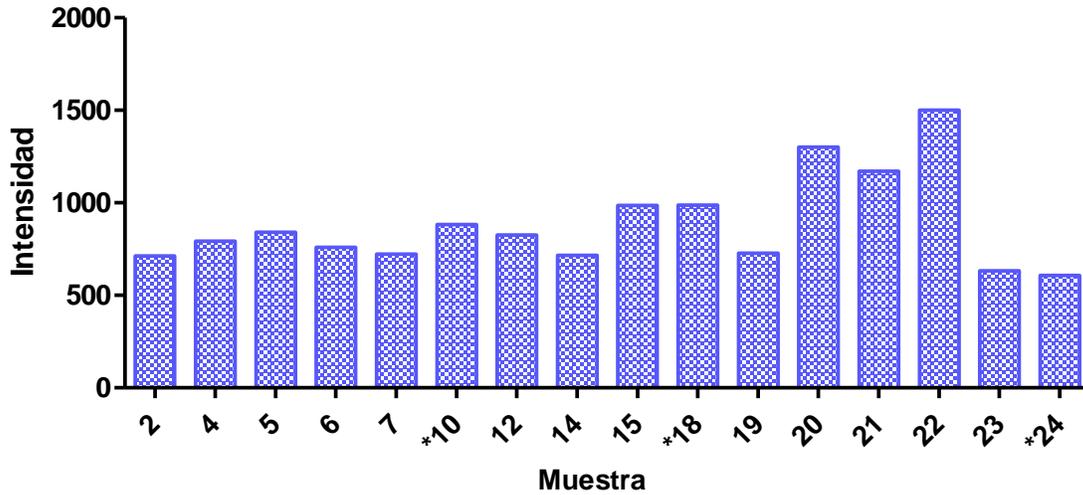
Además es importante establecer una posible correlación entre la expresión de los genes con la edad del paciente, aunque las correlaciones sean semi-cuantitativas se podría observar en que grupo de edad se expresan con mayor frecuencia ambos genes, *ARG1* y *ANXA3* (Gráfico 3).



Gráfica 3. Correlación cualitativa de la expresión de los genes *ARG1* y *ANXA3* por rango de edad. El gráfico representa una distribución de frecuencias de las muestras donde se observó la expresión de los genes de acuerdo al rango de edad. En la que es posible observar que el rango de 31≥45 años tiene una mayor frecuencia de expresar ambos genes.

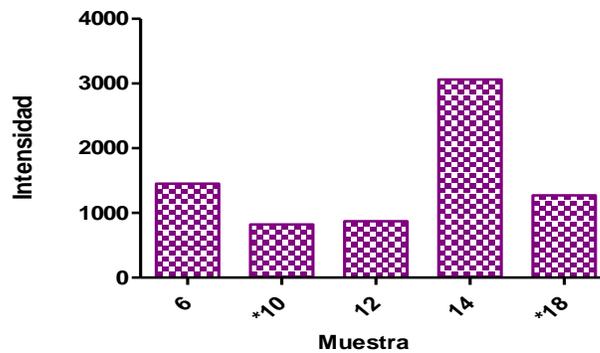
ESTUDIO DENSITOMÉTRICO

Se realizó el estudio densitométrico para cada una de las imágenes de las figuras 9, 10 y 11, mediante el programa Quantity One, el cual nos proporciona una medición cuantitativa en número de píxeles, de acuerdo a la intensidad de señal que se observa en cada imagen. En las siguientes figuras se muestra la gráfica de acuerdo a la medición de banda (píxeles) para cada uno de las muestras de los tres genes (Gráficas 4-6).



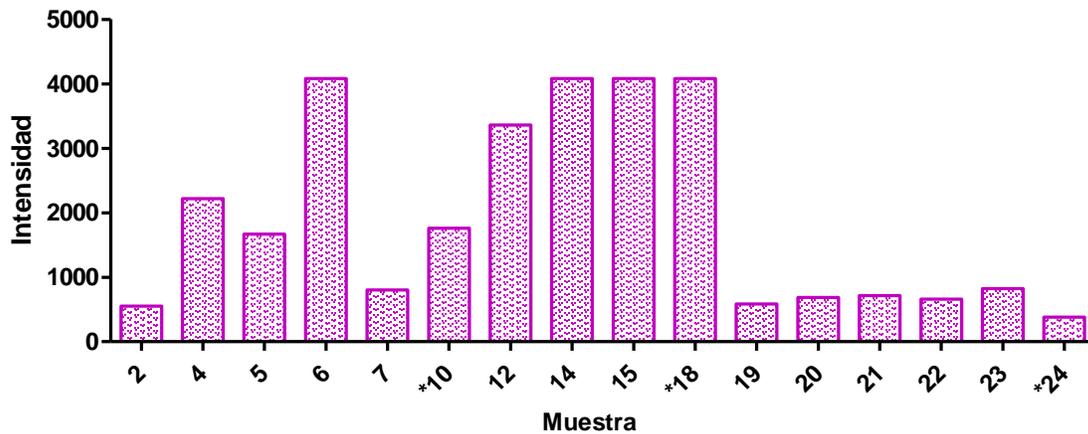
Gráfica 4. Análisis densitométrico para el gen *HPRT*. Se graficó el pico de la intensidad de banda respecto de cada una de las muestras. Se puede observar que la bandas más intensas en pixeles fueron las muestras 20, 21 y 22 el promedio para este gen fue de 884 pixeles.

En la Gráfica 5 se destaca que la expresión del gen *ARG1* solo se observó en 5 muestras, de las cuales la 10 y 18 son controles.



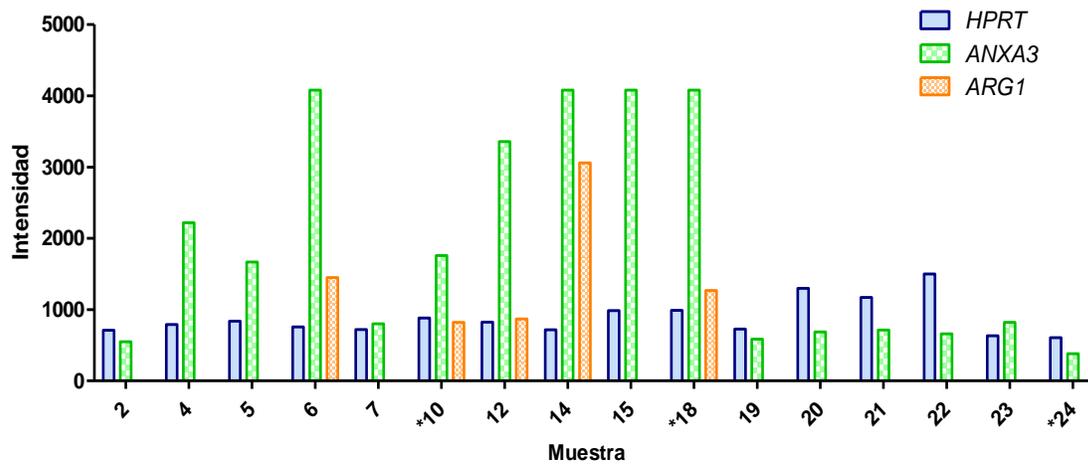
Gráfica 5. Análisis densitométrico para el gen *ARG1*. Es posible observar que la muestra con mayor intensidad es la 14 con expresividad leve. Las muestras 10 y 18, son controles familiares y el promedio de expresión es de 1045 pixeles.

En la Gráfica 6 es posible observar que el gen de la anexina A3, se expresó en todas las muestras con diferente intensidad como se representa a continuación.



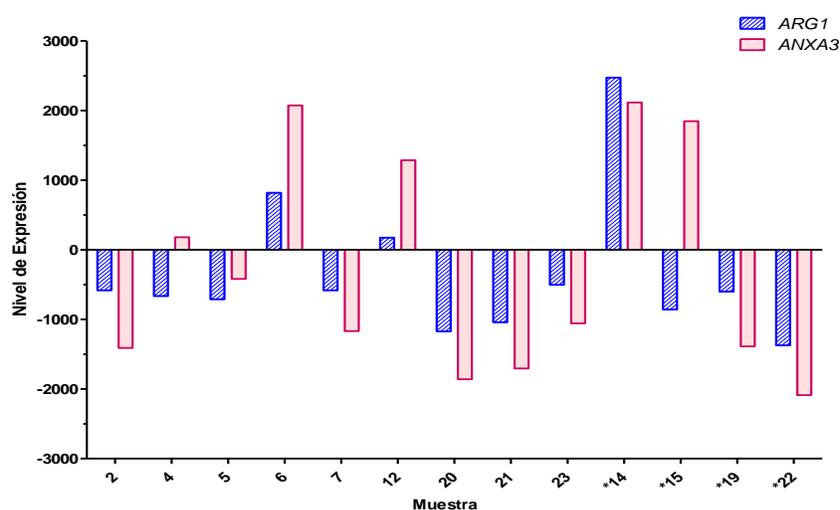
Gráfica 6. Análisis densitométrico para el gen *ANXA3*. Podemos observar que las muestras que exponen la mayor intensidad en pixeles son las muestras 6,14,15 y la 18.

En la Gráfica 7 se representa de forma comparativa la expresión de los genes de interés con respecto al gen constitutivo.



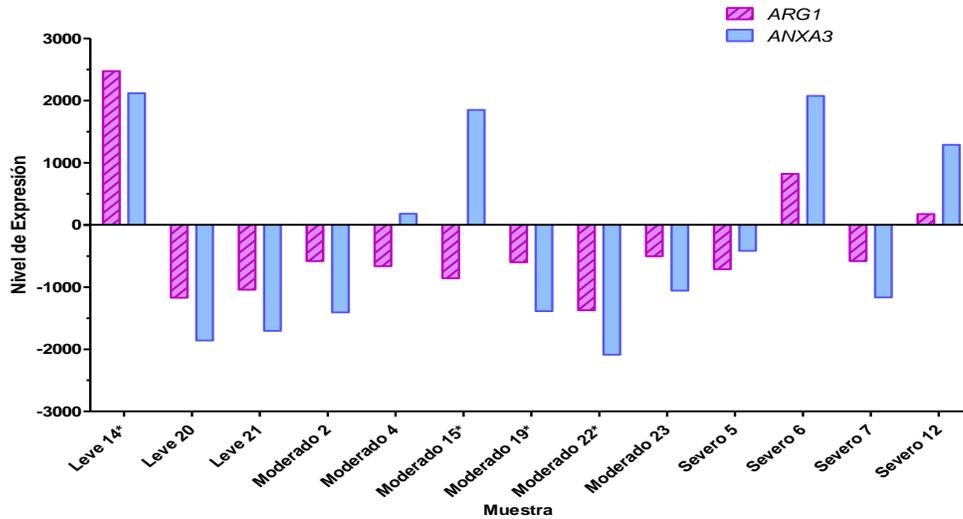
Gráfica 7. Análisis densitométrico comparativo de los genes *HPRT*, *ANXA3* y *ARG1*. Es posible observar de forma comparativa la intensidad de banda que amplificaron las muestras para cada uno de los genes.

Cabe resaltar que en esta gráfica, se incluyeron los datos sin normalizar y se observa diferencias entre los tres genes. Sin embargo, al realizar la normalización de datos entre el gen constitutivo y los genes de interés, se hace evidente que las muestras 2,5,7,20,21,23,19 y 22 están infra expresadas para ambos genes y solo las muestras 6, 12 y 14 tienen sobre expresados *ARG1* y *ANXA3*. Así también podemos observar como las muestra 4 y 15 presentan el mismo efecto al observarse anexina A3 sobre expresado y arginasa 1 infra expresado, como se observa en la gráfica 8.



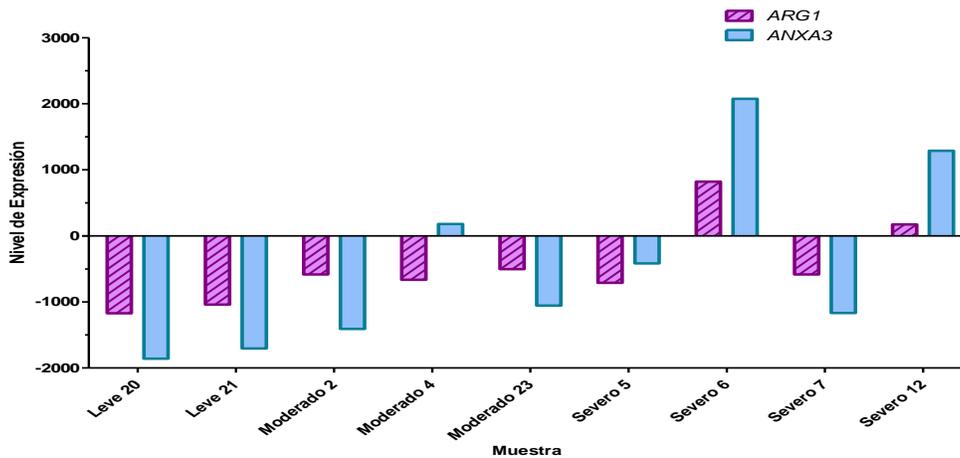
Gráfica 8. Normalización de la Expresión de los genes *ARG1* y *ANXA3*. Se muestra la sobre expresión o infra expresión de los genes de interés

Al analizar cada una de las muestras de pacientes de acuerdo a expresividad clínica y el nivel de expresión que se observó en cada gen, podemos ver en la gráfica 9, que del grupo de expresividad clínica leve, dos están infra expresados y solo la muestra 14 esta sobre expresada para ambos genes, del grupo de moderados las seis muestras están infra expresados para *ARG1* y *ANXA3* y solo dos están sobre expresados para anexina, siendo la muestra 4 y 15, así mismo del grupo de severos las muestras 5 y 7 están infra expresados, y las muestras 6 y 12 están sobre expresados para ambos genes. Sin embargo se debe considerar que de estas 13 muestras cuatro de ellas no tienen completo el estudio exhaustivo de datos clínicos.



Gráfica 9 Análisis comparativo entre los genes *ANXA3* y *ARG1* y la Expresividad Clínica de cada muestra. Una vez que se normalizaron los datos con el grupo control, se agrupó cada una de las muestras de acuerdo a la expresividad clínica de leve, moderada y severa.

Al realizar el análisis estadístico para la correlación de la expresividad clínica y la expresión de los genes *ARG1* y *ANXA3* en cada una de las muestras, se descartaron aquellas que no tienen los datos clínicos completos, como son la muestras 14, 15, 19 y 22, por lo que podemos observar en la gráfica 10 que el 66% de los pacientes están infra expresados para el gen de *ANXA3*, y para *ARG1* el 77 %.



Gráfica 10. Correlación entre la expresividad clínica y la expresión de los genes *ANXA3* y *ARG1*. Se descartaron cuatro muestras que no tenían el estudio clínico completo y se observa como resultado un mayor porcentaje de infra expresión para ambos genes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA AMBOS GENES *ANXA3* Y *ARG1*

Se realizó el análisis estadístico para correlacionar la expresividad clínica de acuerdo a la expresión de cada uno de los genes. Dicha expresividad se determinó de acuerdo al número de neurofibromas y manchas café con leche. Al analizar la tabla de correlación se puede decir que hay una expresión estadísticamente significativa en los genes *ANXA3* y *ARG1*, debido a la infra expresión que se observa en los datos presentados anteriormente, esto se podría explicar si ambos genes compartieran una vía en común, ya que resulta lo mismo medir uno u otro gen en estas 9 muestras. Por otro lado se realizó una correlación directa de Pearson, y se pudo observar que si existe una correlación entre el número de manchas café con leche y la severidad de cada una de las muestras, de acuerdo al nivel de expresión de ambos genes, lo anterior se podría sustentar si se incrementara la n de 29, para obtener un alfa de 0.05, beta de 0.20 y un $r= 0.5$, en este estudio solo logran observar las gráficas que muestras que si existe una correlación entre las variable (Figura 13).

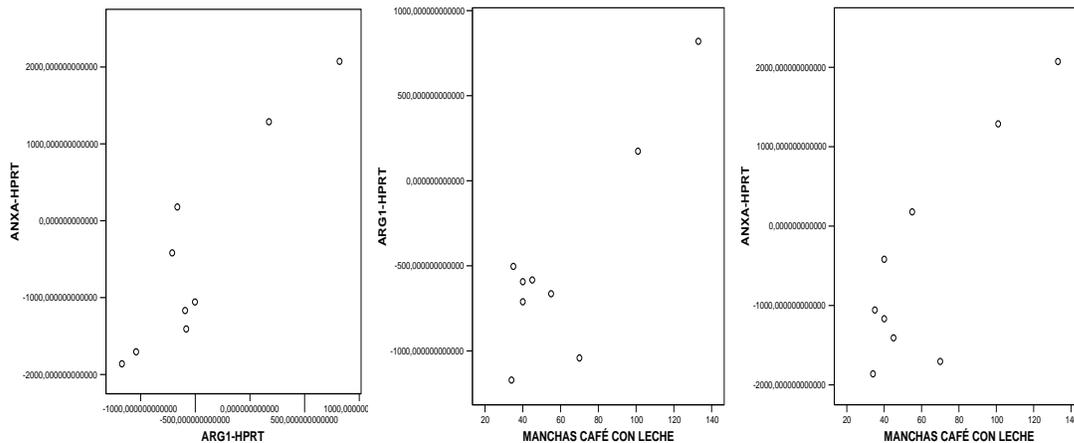


Figura 13. Diagramas de dispersión que se obtuvieron con el programa SSPS. Donde se muestra que hay significancia estadística entre las manchas café con leche y la expresión de los genes de interés.

Concluido el análisis de resultados planteados anteriormente, se consideró indispensable realizar la secuenciación de algunas de las muestras que en la figura 11, se observan con diferente peso molecular al esperado del gen de *ANXA3*.

SECUENCIACIÓN DE MUESTRAS DEL GEN *ANXA3*

Debido a que los productos de PCR para el gen *ANXA3*, mostraron dos pesos diferentes en la electroforesis en gel de agarosa; se decidió secuenciar cuatro muestras, las muestras 4 y 5 que se encontraron por encima del peso y las muestras 6 y 18 que se encontraban por debajo del peso (498pb). En las siguientes figuras se pueden observar los resultados de la secuenciación posterior y el análisis con el programa FINCH tv.

En la Figura de abajo se observa el análisis de la muestra 4 que tenían un peso de 550 pb. La secuencia analizada mostró el patrón de amplificación que se observa en la Figura 14 A. Posteriormente dicha secuencia se introdujo al programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), de la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) donde se observa que dicha secuencia corresponde al mensajero de *ANXA3* como se ve en la Figura 14B.

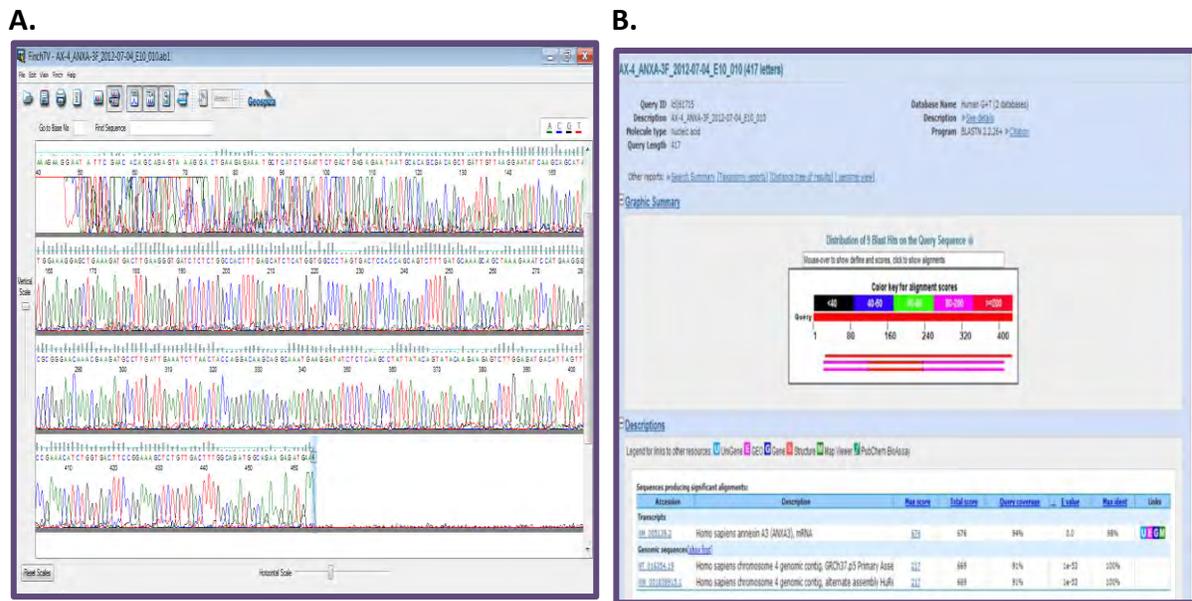


Figura 14. Análisis de la secuencia de la muestra 4. A. Patrón de amplificación de la muestra 4, en donde se puede observar la secuencia de nucleótidos del 50 al 465. B. El resultado del alineamiento muestra que la secuencia corresponde con el mRNA del gen *ANXA3*.

Posteriormente, se revisó la homología que presentan las secuencias identificadas con este gen y se pudo observar que fue del 100 % de acuerdo al número de bases de cada una de las secuencias Figura 15.

```

Features in this part of subject sequence:
  annexin A3
Score = 217 bits (117), Expect = 1e-53
Identities = 117/117 (100%), Gaps = 0/117 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 115      AGGAGCTGAAAGATGACTTGAAGGGTGATCTCTCTGGCCACTTTGAGCATCTCATGGTGG 174
                |||
Sbjct 4011162  AGGAGCTGAAAGATGACTTGAAGGGTGATCTCTCTGGCCACTTTGAGCATCTCATGGTGG 4011221

Query 175      CCTAGTGACTCCACCAGCAGCTTTGATGCAAAGCAGCTAAAGAAATCCATGAAGG 231
                |||
Sbjct 4011222  CCTAGTGACTCCACCAGCAGCTTTGATGCAAAGCAGCTAAAGAAATCCATGAAGG 4011278

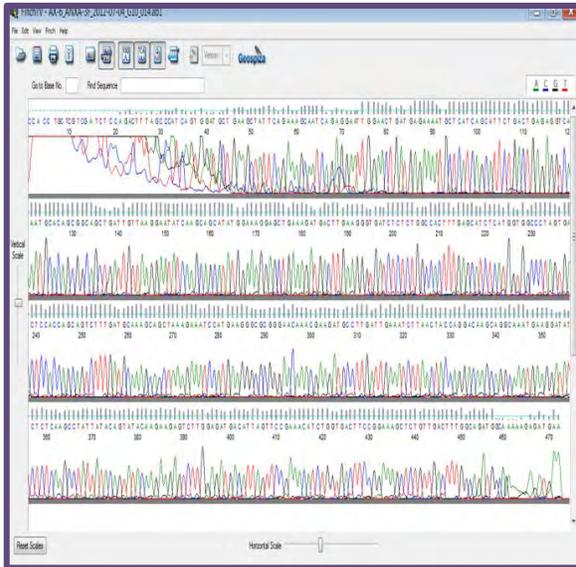
```

Figura 15. Homología de la secuencia de la muestra 4. La base de datos del NCBI permite verificar el porcentaje de homología con las secuencias del gen, en donde se puede observar en en distintas regiones corresponde al 100%.

Se realizó el mismo análisis a la muestra 5, que presentaba el mismo peso molecular de 550 pb dando como resultado el 100% de homología al gen ANXA3.

Por otro lado, también fueron analizadas las muestras 6 y 18 debido a que los productos de amplificación que se encontraron tenían un peso de 450pb aproximadamente, por abajo del esperado de 498pb, a continuación se muestra el análisis de las secuencias de la muestra 6. La secuencia analizada mostró el patrón de amplificación que se observa en la Figura 16A. Dicha secuencia se introdujo nuevamente al programa BLAST de la base de datos de NCBI donde se observa que corresponde al RNA mensajero de ANXA3 como se ve en la Figura 16B.

A.



B.

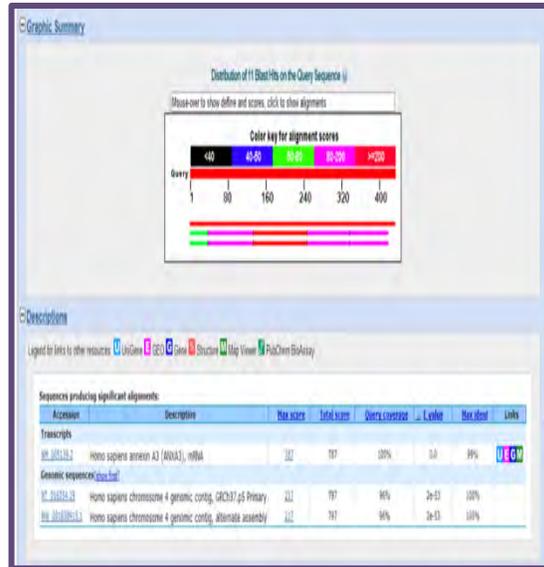


Figura 16. Análisis de la secuencia de la muestra 6. A. Patrón de amplificación de la muestra 6, en donde se puede observar la secuencia de nucleótidos 44 al 472. B. El resultado del alineamiento muestra que la secuencia corresponde con el mRNA del gen ANXA3.

Como se puede observar en la Figura 17, se examinó la relación que presentó la secuencia identificada con este gen y se pudo verificar que para la muestra 6 esta homología fue del 100 % de acuerdo al número de bases de cada una de las secuencias.

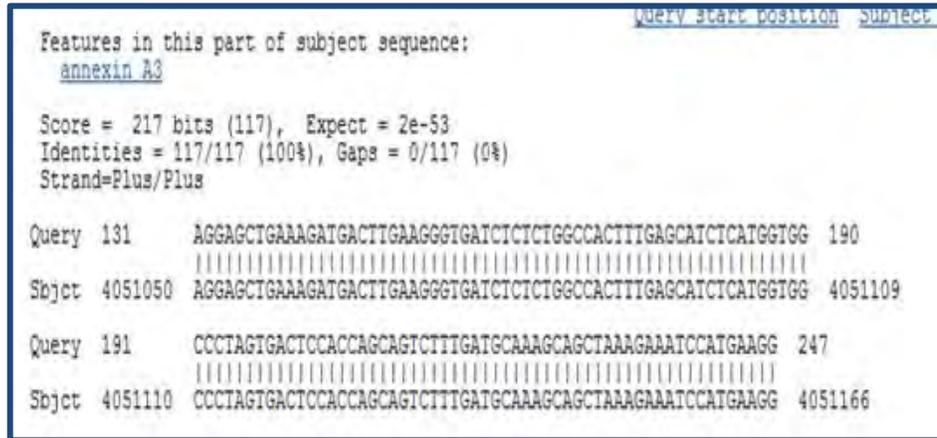


Figura 17. Homología de la secuencia de la muestra 6. En esta figura se muestran los segmentos en los que la secuencia 6 es homóloga a las secuencias del gen ANXA3 en diversos fragmentos, esta homología entre ambas secuencias es del 100%.

El análisis de la muestra 18, que es una muestra de control familiar, presentó los mismos resultados, que corresponden al 100 % de homología del gen ANXA3, por lo que se consideró que la diferencia en el tamaños de productos para este gen, fue un efecto del corrimiento electroforético.

Discusión

La Neurofibromatosis tipo 1, ha sido poco estudiada debido al tamaño del gen involucrado en la patología; el gen *NF1* se extiende por más de 350 kb, a pesar de esto se han aplicado diversas técnicas para el estudio de mutaciones que son capaces de presentarse en los 60 exones, este gen, tiene elevada tasa de mutación (*Basllesta, 2008*).

Es importante determinar si tejidos como la sangre periférica pueden emplearse para buscar marcadores indirectos en el desarrollo de esta enfermedad, la malignización de los neurofibromas, o la aparición de algún otro proceso de cáncer. Actualmente se han buscado marcadores con funciones diferentes: como marcador del curso de la enfermedad, marcador de exposición a fármacos o marcadores de eficiencia de los mismos. Considerando que la sangre se puede obtener de forma poco invasiva.

Sin embargo en estudios recientes, en los cuales se han analizado perfiles de expresión o transcripcionales entre controles sanos y algunas neoplasias, se ha hecho referencia que en sangre periférica se han encontrado genes constitutivos que con frecuencia se usan en estudios de tejido específico, no pueden ser empleados en sangre periférica, debido a que están comprometidos con la patología o la vía, como *GADPH* el cual se ha reportado sobre expresado en varios procesos malignos como cáncer de ovario, tiroide, hepatocelular y pancreático además de que se encontró sobre expresado en las células mononucleares de sangre periférica (*Bak, 2008*), han sugerido como gen control *HPRT*, sin embargo, este puede verse comprometido al participar en la síntesis de purinas y en la producción de ácido úrico. Para sangre periférica se sugiere emplear como gen control alguna subunidad de RNA, la cual no esta comprometida a este nivel.

En los pacientes con *NF1* se encuentra involucrado el mecanismo de inmunidad innata, ya que existe un proceso de respuesta inflamatoria el cual es mediado por algunos

mastocitos, los cuales forman parte de la estructura normal de los axones, que pueden tener una mutación en el gen *NF1* y forman los llamados neurofibromas, esto se debe considerar como lo hizo *E. Burczynski* en 2005, quién encontró que es posible ver reflejado un cambio en la respuesta inmune de las células circulantes en pacientes con carcinoma de células renales.

La expresión de *ARG1* se ha visto involucrada en procesos inflamatorios y de inmunosupresión, en la revisión realizada en 2009 por *Markus Munder* se menciona que la participación de arginasa 1 en la patogénesis de una enfermedad puede verse involucrada de tres formas: a) en la supresión de la citotoxicidad mediada por óxido nítrico (*NO*), a través del consumo de L-arginina, b) mediante la síntesis de colágeno generado a través de hidroxilación de prolina, c) debido al aumento de la proliferación celular a causa de la síntesis de prolina; estas posibilidades nos dan la pauta para pensar que en una enfermedad como la *NF1* es posible encontrarla expresada. Así mismo, esta enzima puede estar altamente expresada en células inmunes. Sin embargo, estos reportes difieren con nuestros resultados ya que de las 9 muestras analizadas el 77% tiene una infra expresión para el gen *ARG1*, como se muestra en la gráfica 10. Es importante resaltar que en el grupo de expresividad leve y moderada no hay expresión de Arginasa 1; sin embargo, resulta interesante observar que en el grupo de expresividad severa, el 50% de los pacientes tiene arginasa sobre expresada. La característica clínica que comparten las muestra 5 y 7, que están sub expresados para arginasa 1, es porque tienen menor número de manchas café con leche que las muestras 6 y 12 que están sobre expresadas. Lo anterior, corrobora la significancia estadística, la cual correlaciona la severidad de la expresividad clínica de acuerdo al número de manchas café con leche y la expresión del gen *ARG1*.

Cabe recordar que nuestra medición es de tipo semi cuantitativo, por lo que nuestros resultados de acuerdo a la expresión de *ARG1*, son contrarios a los resultados reportados en diversos estudios como los de *Kitowska K* (2007), *Morrison M* (2009) y *Yan BC* (2010)

en donde la expresión del gen se ve involucrada con los diversos procesos de malignidad. De acuerdo a nuestros análisis estadístico y a estos reportes sería importante ampliar el número de muestras para determinar *ARG1*, además de utilizar un método cuantitativo como PCR en tiempo real, dada la importancia que ha tomado este gen como un marcador pronóstico en procesos de cáncer, sería indispensable corroborar su comportamiento en pacientes con NF1, no sólo para indicar posible malignidad de los MPNSTs también en cualquier otro tipo de proceso de malignidad implicado en la vías de señalización tanto como para *Ras* y *NF1* e incluso en procesos de inflamación, lo cuales se encuentran asociados con Neurofibromatosis.

Respecto al estudio de la expresión de *ANXA3* es importante resaltar, que en diferentes tipos de cáncer se ha encontrado al gen y a la proteína de anexina A3 sobre expresada, algunos han relacionado su expresión con los diferentes estadios de severidad. En nuestro estudio esperábamos que a mayor severidad de la neurofibromatosis tipo 1 la expresión del gen estuviera incrementada. Sin embargo, lo que observamos en la figura 12, fueron productos de diferente peso molecular, con una variación de aproximadamente 50pb hacia arriba y hacia abajo del producto esperado (498pb). Esto podría explicarse de acuerdo a lo reportado por *Bianchi C.* en el 2010, en el cual se menciona que existen dos isoformas de la proteína anexina A3, una de 33 kDa y otra de 36, esto se genera mediante un splicing alternativo del exón III, el análisis de la diferencia de estas isoformas es posible realizarlo mediante la secuenciación de los fragmentos para verificar, o mediante la restricción del fragmento en el que ambas isoformas difieren, se sabe que existe una pérdida de 39 aa, esto produce la diferencia entre el peso molecular de las dos anexinas. Es importante considerar que la transducción de la anexina de 33 kDa solo es posible si el codón de inicio corresponde a metionina del exón IV, además se ha relacionado con la activación de HIF-1. Las dos variantes de la anexina se pueden encontrar en neutrófilos y monocitos por lo que es posible que ambas secuencias sean amplificadas con el mismo juego de primers.

La expresión de gen *ANXA3* se encontró en el 66% de las muestras, sin embargo, resalta que en la muestra 4 con expresividad moderada, este gen se encuentre sobre expresado, comportándose como las muestras 6 y 12 de expresividad severa. Al revalorar la revisión clínica podemos establecer que este paciente con número de muestra 4 y expresividad moderada, también se debe considerar como paciente de expresividad clínica severa, ya que tiene un alto número de manchas café con leche y neurofibromas. Sin embargo, en este paciente llamó mucho la atención, que tiene arginasa 1, infra expresada a diferencia de las muestras 6 y 12. Al observar este comportamiento se le realizó un cariotipo y encontramos que presenta un resultado: mos47,XY,+r(6)(p25q27)[3]/46,XY,r(6)(p25q27)[1]/46,XY,[96], este resultado podría estar modificando la expresión del gen *ARG1*, ya que dicho gen se encuentra en el cromosoma 6, sin embargo es necesario realizar otras pruebas moleculares. Este hallazgo originó que la familia se estudie por separado para otras pruebas moleculares.

Conclusiones

En las 9 muestras que fueron analizadas estadísticamente, en su mayoría se encuentran infra expresadas en ambos genes con respecto a los tres controles sin la enfermedad que se incluyeron en el estudio.

Al realizar el análisis estadístico de correlación en ambos genes se observa una significancia estadística, sin embargo es preciso replantear el número de muestras (29) para corroborar los hallazgos encontrados y encontrar el valor de $r=0.5$

La correlación clínica entre la expresión de *ANXA3* y *ARG1* se observó con el número de manchas café con leche, mediante una correlación directa de Pearson. También se logra observar una correlación en la escala de severidad y las manchas café con leche. A mayor número de manchas, mayor severidad o expresividad clínica, como lo que se observó en las muestras 6 y 12 para ambos genes.

Propuestas y/o recomendaciones

- * Es posible realizar mediante un estudio en suero la actividad de la enzima arginasa 1 y correlacionar con la expresión el gen.
- * Con base a los resultados obtenidos se propone realizar la cuantificación de la expresión de los genes mediante qRT-PCR.
- * Otra alternativa es el estudio de la proteína como el Western Blot para relacionar la expresión del mensajero con la expresión de la proteína.
- * Es necesario realizar estos estudios con un mayor número de muestras a fin de aplicar la prueba estadística que valide la correlación entre la expresividad clínica de Neurofibromatosis tipo 1 y la expresión de los genes *ARG1* y *ANXA3*.

Referencias

- Arun D Singh, Bertil E. Damato, et.al. *Oncología Clínica Oftalmológica*. Barcelona. Elsevier España. 2009: 234-235.
- Radhika A., Kent M., et.al. The Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Tumor Suppressor is a Modifier of Carcinogen-Induced Pigmentation and Papilloma Formation in C57BL/6 Mice. *J Invest Dermatol*. 2000; 114(6): 1093–1100.
- Bak P., Alonso A., et.al. Murine ovarian cancer vascular leukocytes require arginase-1 activity for T cell suppression. *Molecular Immunology* 2008; 46: 258–268
- Bianchi C., Bombelli S., et.al. Primary Cell Cultures from Human Renal Cortex and Renal-Cell Carcinoma Evidence a Differential Expression of Two Spliced Isoforms of Annexin A3. *AJP*, 2010; 176(4): 1660-1670.
- Bieché I., Levy P., et.al. Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR. *Molecular Cancer* 2004; 3:20.
- Bièche I., Pasmant E., et.al. Identification of Genes Potentially Involved in the Increased Risk of Malignancy in NF1-Microdeleted Patients. *Mol Med* 2011; 17(1-2): 79-87.
- Bollag G, McCormick F, Clark R. Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *Embo J* 1993; 12(5):1923-7.
- Burczynski ME, Twine NC, et.al. Transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells prognostic of clinical outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(3): 1181-9.
- Cabec V., Maridonneau-Parini I. Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells. *Biochem J*. 1994; 303: 481-487.
- Cao W., Bill S., et.al. Hepatitis C Virus target over-expression of Arginase I in Hepatocarcinogenesis. *Int. J Cancer*, 2009; 124 (12): 2886-2892.
- Shilyanskaya C., Karlsgodt K., et.al. Neurofibromin regulates corticostriatal inhibitory networks during working memory performance. *PNAS*: Julio 20, 2010; 107(29): 13141-12146
- Chao A, Wang TH, Lai CH. Overview of Microarray Analysis of Gene Expression and its applications to cervical cancer investigation. *J Obstet Gynecol*. 2007;46(4):363-73

- De Luca A, I Bottillo, et.al.] NF1 Gene mutation represent the major molecular event underlying Neurofibromatosis-Noonan Syndrome. *Am J Hum. Genet*, 2005; 77:1092-1101.
- De Luca, I Bottillo, et.al. Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet* 2007; 44: 800–808.
- Díaz Rubio, García Conde. *Oncología Clínica básica*. España. Ediciones, 2000; 50-55.
- Fernández Vozmediano, Armario Hita. Neurofibromatosis; Esquema de diagnóstico y seguimiento. *Piel* 2002; 17(6):259-269
- Fernández-Mayoralas, Fernández-Jaéna et.al. Trastornos neurocutáneos en la población infantil. *Medicina hoy. JANO*. 2007; LXVII; 1.533: 24-30
- Halling KC, Scheithauer BW, et al. p53 expression in neurofibroma and malignant peripheral nerve sheath tumor. An immunohistochemical study of sporadic and NF1 associated tumors. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 282-288.
- Hiatt K, Ingram A, Huddleston H. Loss of the NF1 Tumor Suppressor Gene Decreases Fas antigen expression in myeloid cells. *A.J. of Gene Pathology* 2004; 164, 4: 1471-1479.
- Instituto Nacional de Pediatría. Neurofibromatosis tipo I. Modificado 10 de abril del 2009. [Consultado el 24 de Julio del 2011]. Disponible en http://www.salud.gob.mx/unidades/pediatria/asmedica_5.html
- J. Gurdia Massó. *Medicina Interna*. Masón S.A. Barcelona 2007: vol.2: 2114-2127.
- Batra S., Baine M., et.al. Transcriptional Profiling of Peripheral Blood Mononuclear cells in Pancreatic Cancer Patients Identifies Novel Genes with Potential Diagnostic Utility. 2011; 6 (2); e17014: 1-10.
- Kirilenko A., Golczak M., et.al. GTP-binding properties of the membrane-bound form of porcine liver annexin VI. *ABP*, 2001; 48 (4): 851-867.
- Kitowska K., Dariusz Z., et.al. Funtional role and species-specific contribution of arginases in pulmary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 294: L34-L45.
- Lay-Chin Y., Chee-Keat L., et.al. Hydrophobic protein in colorrectal cancer in relation to tumor stages and grades. *World J Gastroenterol*. 2010; 14; 16(22): 2754-2763.
- Leal IA., Jackson MA., et.al. Genetic pathways and mutation profiles of human cancer: sites and exposure-specific patterns. *Carcinogenesis*. 2007; 28(9): 1851-1858.
- Lee P., Cohen J., Tendi E., Fields D. Transcriptional profiling in an MPNST- derived cell line and normal human Schwann cells. *Neuron Glia Biol*. 2004; 1(2): 135-147.

- Listernick R., Charrow J. Neurofibromatosis type 1 in childhood. *J Pediatr.* 1990; 116(6): 845-853.
- Liu YF., Xiao ZQ., et.al. Quantitative proteome analysis reveals annexin A3 as a novel biomarker in lung adenocarcinoma. *J Pathol.* 2009; 217: 54–64
- Markus Munder. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system, *British Journal of Pharmacology* 2009; 158, 638–651.
- Ming-Hong S., Harper PS., et.al. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1(NF1). *J Med Genet* 1996; 33: 2-17
- Mitsuharu E., Toshihide Y. Inactivation of Ras by p120GAP via Focal Adhesion Kinase Dephosphorylation Mediates RGMa-Induced Growth Cone Collapse. *J. of Neuroscience.* 2009; 29(20): 6649-6662.
- Morris Sidney M. Recet advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal Pharmacology.* 2009; 157, 922-930.
- National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine 2012 [acceso 9 de febrero 2012] ARG1 arginase, liver [*Homo sapiens*] Gene ID: 383. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/383>
- National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine 2012 [acceso 9 de febrero 2012] ANXA3 annexin A3 [*Homo sapiens*] Gene ID: 306. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/306>
- Olivia R., Ballesta F, et.al. *Genética Médica.* Barcelona. Díaz de Santo Ediciones. 2008; 207.
- Park JE., Lee DH., et.al. Annexin A3 is a potential angiogenic mediator *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 337:1283–1287.
- Gannon PO., Godin-Ethier J., et.al. Androgen-Regulated Expression of Arginase 1, Arginase 2 and Interleukin-8 in Human Prostate Cancer. 2010; 5(8); e12107.
- Ríos H., Hernández M. Los genes supresores de tumores y el Cancer. *Rev Cubana Oncol.* 2001;17(1):65-71
- Rodríguez R., Pérez P., et.al. Neurofibrosarcoma con metástasis pulmonares en paciente con neurofibromatosis tipo I. *An. Med. Interna (Madrid)* [revista en Internet]. 2008 [citado 2012 Feb 07]; 25(3): 152-153.
Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992008000300013&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4321/S0212-71992008000300013>.

- Bendova S., Krepelova A., et.al. Novel mutations in the NF1 gene in Czech patients with neurofibromatosis type 1. *J. Mol. Neuroscience*. 2007; 31(3): 273-279.
- Shuka VK., Tandon A., et.al. Arginase activity in carcinoma of the gallbladder: a pilot study. *Eur J Cancer*. 2009; 18(3): 199-202.
- Shunji Y., Hiroshi T., et.al. Neurofibromatosis Type I Tumor Suppressor Neurofibromin Regulates Neuronal Differentiation via Its GTPase-activating Protein Function toward Ras. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008; 278(29): 26958–26969.
- Sopkova J., Raguenes N., et.al. Ca⁺² and membrane binding to annexin 3 modulate the structure and dynamics of N terminus and domain III. *Protein Science*. 2002; 11:1613-1625.
- Stephen J., Vishwanash R., et.al. *Fisiopatología de la enfermedad*, Prentice Hall, 1995.
- Taboada L., Lardoeyt F. Criterios para el diagnóstico clínico de algunos síndromes genéticos. *Rev Cubana Pediatr*. 2003; 75.
- Tait JF., Frankenberry DA., et.al. Chromosomal localization of the human annexin III (ANX3) gen. *Genomics*, 1991; 10(2): 441-448
- Twine N., Stover J., et.al. Disease-associated Expression Profiles in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research*, 2003; 63: 6069–6075.
- Villa M. Estudio de perfil de expresión en pacientes con Neurofibromatosis tipo 1: expresividad clínica moderada y severa. [Tesis para el título de Maestro en Ciencias en Biomedicina Molecular] México D.F. Instituto Politécnico Nacional. 2009.
- Volker G., Stephen E. Annexins: From Structure to Function. *Physiol Rev*. 2002; 82: 331-362.
- Welsh JB., Zarrinkar PP., et.al. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *PNAS* 2001; 98(3): 1175-1181.
- Klauss W., Goldsmith LA., et.al. *Dermatología en Medicina General*. 7ª ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. 2009, Vol.III: 1333.
- Yan BC, Gong C, et.al. Arginase 1: a new Immunohistochemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 2010; 34 (8): 1147-1154
- Yang JY, Zong CS, et.al. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOX3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol*. 2008, 10(2): 138-148
- Yuan Z., Pritam G., et.al. Neurofibromas in NF1: Schwann Cell Origin and Role of Tumor Environment. *Science* 2002; 296 (5569); 920-922.